



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월16일
(11) 등록번호 10-1569479
(24) 등록일자 2015년11월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7026012
 (22) 출원일자(국제) 2012년03월29일
 심사청구일자 2013년10월01일
 (85) 번역문제출일자 2013년10월01일
 (65) 공개번호 10-2013-0130858
 (43) 공개일자 2013년12월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/KR2012/002331
 (87) 국제공개번호 WO 2012/134195
 국제공개일자 2012년10월04일
 (30) 우선권주장
 1020110028345 2011년03월29일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 Nat. Biotechnol., Vol. 17, No. 3, pp. 292-296
 (1999.03.01.)
 Clin. Chem., Vol. 47, No. 8, pp. 1373-1377
 (2001.08.)
 W02011027966 A2

- (73) 특허권자
주식회사 씨젠
 서울특별시 송파구 오금로 91, 8층 9층 (방이동, 태원빌딩)
 (72) 발명자
천중윤
 서울특별시 강남구 영동대로 142길 21 청담동 마크힐스 청담1차 1901호
이영조
 서울 송파구 올림픽로 435, 112동 3501호 (신천동, 파크리오)
 (74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 66 항

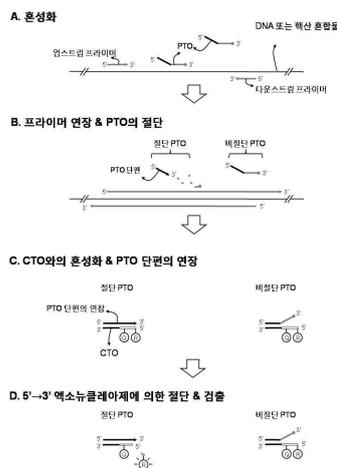
심사관 : 윤준호

(54) 발명의 명칭 PTO 절단 및 연장-의존적 절단에 의한 타겟 핵산서열의 검출

(57) 요약

본 발명은 PCEC(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage) 어세이에 의한 타겟 핵산서열의 검출에 관한 것이다. 본 발명은, 타겟 핵산서열의 존재 유무에 따라 형성되는 연장 이합체 상에 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치가 생성되는 것에 특징이 있다. 본 발명은 연장 이합체 절단의 발생을 검출하며, 이에 의해 타겟 핵산서열의 존재를 결정한다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하는 방법:

(a) 상기 타겟 핵산서열을 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)와 혼성화 시키는 단계로서; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 PTO의 업스트림에 위치하고;

(b) 상기 PTO의 절단을 위한 조건 하에서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 상기 단계 (a)의 결과물을 접촉시키는 단계로서; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 연장 가닥은 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하며, 이러한 상기 절단은 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고;

(c) 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편과 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)를 혼성화 시키는 단계로서; 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되고;

(d) 상기 단계 (c)의 결과물 및 주형-의존적 핵산 중합효소를 이용하여 연장반응을 실시하는 단계로서; 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성되고;

(e) 상기 핵산 절단효소를 이용하여 상기 연장 이합체를 절단하는 단계로서, 절단된 단편이 생성되며; 그리고

(f) 상기 연장 이합체의 절단의 발생(occurrence)을 검출하는 단계로서; 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 제한효소이고, 상기 CTO의 템플레이팅 부위는 상기 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함하며, 상기 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 상기 제한효소의 절단 위치를 생성시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 리보뉴클레아제이고, 상기 CTO의 템플레이팅 부위는 RNA 서열을 포함하며, 상기 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 형성시켜 상기 리보뉴클레아제의 절단 위치가 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제이고, 상기 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 상기 CTO 상에 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치를 생성시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 DNA 이합체, RNA 이합체 또는 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 절단하는 핵산 절단효소의 절단 위치인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 리보뉴클레아제는 RNase H 또는 Exo III인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 5' →3' 엑소뉴클레아제는 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 열안정성 핵산 절단효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 연장 이합체는 최소 1 종의 표지를 갖고, 상기 표지는 상기 PTO 또는 CTO에 연결된 표지 또는 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)로부터 유래되며, 상기 연장 이합체의 절단의 발생의 검출은 상기 최소 1 종의 표지로부터의 시그널을 검출하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 CTO는 단일표지를 갖고, 상기 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 연장 이합체가 절단되기 이전의 단일표지로부터 나오는 시그널은 상기 연장 이합체가 절단된 이후의 단일표지로부터 나오는 시그널과 상이하여, 이러한 시그널들의 차이가 상기 연장 이합체의 절단의 발생이 검출되도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단일표지는 형광표지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 상기 CTO에 연결된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치하고, 상기 연장 이합체가 형성되기 이전에는 상기 퀀처 분자는 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하며, 상기 연장 이합체의 절단은 상기 리포터 분자와 상기 퀀처 분자를 서로 분리시키고, 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 표지로부터의 시그널을 측정하여 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 리포터 분자 및 상기 퀀처 분자 중 최소 하나는 상기 CTO의 5' -말단에 연결되는 것을

특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 CT0는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 CT0는 단일표지를 갖고, 상기 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 CT0는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 상기 PTO는 단일표지를 가지며, 상기 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 단일표지는 형광표지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 14 항에 있어서, 상기 CT0는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 인터칼레이팅 염료가 표지로 이용되며, 상기 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 상기 인터칼레이팅 염료를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 상기 PTO 및/또는 CT0는 그의 3' -말단이 블록킹되어 연장이 방지된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머 또는 업스트림 프로브인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의해 상기 PTO의 절단을 유도할 정도로 상기 PTO에 근접해 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 20 항에 있어서, 상기 업스트림 프라이머는 그의 연장 가닥을 통하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 1 항에 있어서, 상기 CTO의 캡처링 부위는 그의 5' -말단 부위에 상기 PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 상기 PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 1-5 개의 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 상기 단계 (a)-(b), (a)-(d), (a)-(e) 또는 (a)-(f)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)-(b) 및 단계 (c)-(f) 또는 상기 단계 (a)-(d) 및 단계 (e)-(f)는 하나의 반응용기 또는 개별 반응용기에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 상기 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 상기 단계 (a)-(b) 또는 (a)-(d)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 1 항에 있어서, 상기 방법을 실시하여 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하고; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 최소 2 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 PTO는 최소 2 종의 PTO를 포함하며, 상기 CTO는 최소 2 종의 CTO를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 최소 2 종의 PTO의 5' -태깅 부위는 서로 동일한 서열 또는 서로 상이한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 1 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머이고, 상기 단계 (b)는 상기 업스트림 프라이머의 상기 연장을 위하여 주형-의존적 핵산 중합효소를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 절단 반응을 위한 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 다운스트림 프라이머의 존재 하에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

다음의 단계를 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하는 방법:

(a) 상기 타겟 핵산서열을 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머를 포함하는 프라이머 한 쌍 및 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)와 혼성화 시키는 단계로서; 상기 PTO 기준의 상기 업스트림 프라이머 및 상기 다운스트림 프라이머 각각은 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며; 상기 PTO는 상기 업스트림 프라이머 및 상기 다운스트림 프라이머 사이에 위치하고; 상기 PTO는 그의 3' -말단이 블로킹되어 연장이 방지되며;

(b) 상기 프라이머들의 연장 및 상기 PTO의 절단을 위한 조건 하에서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 핵산 중합효소에 단계 (a)의 결과물을 접촉시키는 단계로서; 상기 PTO가 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되는 경우, 상기 업스트림 프라이머는 연장되고 상기 연장 가닥은 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 핵산 중합효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하며, 이러한 상기 절단은 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고;

(c) 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편과 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)를 혼성화 시키는 단계로서; 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되고;

(d) 상기 단계 (c)의 결과물 및 주형-의존적 핵산 중합효소를 이용하여 연장반응을 실시하는 단계로서; 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성되고;

(e) 상기 핵산 절단효소를 이용하여 상기 연장 이합체를 절단하는 단계로서, 절단된 단편이 생성되며; 그리고

(f) 상기 연장 이합체의 절단의 발생(occurrence)을 검출하는 단계로서; 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 상기 단계 (a)-(b), (a)-(d), (a)-(e) 또는 (a)-(f)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

다음을 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하기 위한 키트:

(a) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide); 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며;

(b) 업스트림 올리고뉴클레오타이드; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 PTO의 업스트림에 위치하며; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 연장 가닥은 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하여 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고; 및

(c) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide); 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 상기 5' -태깅 부위 또는 상기 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 상기 5' -태깅 부위 및 상기 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되고; 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성된다.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 키트는 상기 타겟 핵산 서열에 혼성화된 PTO를 절단하기 위한 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 37

제 35 항에 있어서, 상기 키트는 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편의 연장에 의하여 형성된 연장 이합체의 절단을 위하여 핵산 절단효소를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 또는 리보뉴클레아제인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 제한효소이고, 상기 CTO의 템플레이팅 부위는 상기 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함하며, 상기 연장 이합체의 형성은 상기 제한효소의 절단 위치를 생성시키는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 리보뉴클레아제이고, 상기 CTO의 템플레이팅 부위는 RNA 서열을 포함하며, 상기 연장 이합체의 형성은 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 형성시켜 상기 리보뉴클레아제의 절단 위치가 생성되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 41

제 38 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제이고, 상기 연장 이합체의 형성은 상기 CTO 상에 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치를 생성시키는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 42

제 35 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 DNA 이합체, RNA 이합체 또는 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 절단하는 핵산 절단효소의 절단 부위인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 43

제 38 항에 있어서, 상기 리보뉴클레아제는 RNase H 또는 Exo III인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 44

제 38 항에 있어서, 상기 5' →3' 엑소뉴클레아제는 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합 효소인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 45

제 37 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소는 열안정성 핵산 절단효소인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 46

제 35 항에 있어서, 상기 연장 이합체는 최소 1 종의 표지를 갖고, 상기 표지는 상기 PTO 또는 CTO에 연결된 표지 또는 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)로부터 유래되며, 상기 연장 이합체의 절단의 발생의 검출은 상기 최소 1 종의 표지로부터의 시그널을 검출하여 실시하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 47

제 46 항에 있어서, 상기 CTO는 단일표지를 갖고, 상기 연장 이합체의 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 연장 이합체가 절단되기 이전의 단일표지로부터 나오는 시그널은 상기 연장 이합체가 절단된 이후의 단일표지로부터 나오는 시그널과 상이하어, 이러한 시그널들의 차이가 상기 연장 이합체의 절단의 발생이 검출되도록 하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 상기 단일표지는 형광표지인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 49

제 46 항에 있어서, 상기 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 상기 CTO에 연결된 리포터 분자 및 퀴치 분자 사이에 위치하고, 상기 연장 이합체가 형성되기 이전에는 상기 퀴치 분자는 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀴칭하며, 상기 연장 이합체의 절단은 상기 리포터 분자와 상기 퀴치 분자를 서로 분리시키고, 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 표지로부터의 시그널을 측정하여 검출하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 상기 리포터 분자 및 상기 퀀처 분자 중 최소 하나는 상기 CTO의 5' -말단에 연결되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 51

제 35 항에 있어서, 상기 CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 52

제 51 항에 있어서, 상기 CTO는 단일표지를 갖고, 상기 연장 이합체 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 53

제 51 항에 있어서, 상기 CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 상기 PTO는 단일표지를 가지며, 상기 연장 이합체의 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 54

제 53 항에 있어서, 상기 단일표지는 형광표지인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 55

제 51 항에 있어서, 상기 CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 인터칼레이팅 염료가 표지로 이용되며, 상기 연장 이합체 절단은 상기 인터칼레이팅 염료를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 56

제 35 항에 있어서, 상기 PTO 및/또는 CTO는 그의 3' -말단이 블록킹되어 연장이 방지된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 57

제 35 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머 또는 업스트림 프로브인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의해 상기 PTO의 절단을 유도할 정도로 상기 PTO에 근접해 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 59

제 57 항에 있어서, 상기 업스트림 프라이머는 그의 연장 가닥을 통하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 60

제 35 항에 있어서, 상기 CTO의 캡처링 부위는 그의 5' -말단 부위에 상기 PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 61

제 60 항에 있어서, 상기 PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 1-5 개의 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 62

제 35 항에 있어서, 상기 키트를 이용하여 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하고; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 최소 2 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 PTO는 최소 2 종의 PTO를 포함하며, 상기 CTO는 최소 2 종의 CTO를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 63

제 62 항에 있어서, 상기 최소 2 종의 PTO의 5' -태깅 부위는 서로 동일한 서열 또는 서로 상이한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 64

제 35 항에 있어서, 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머이고, 상기 키트는 상기 업스트림 프라이머의 상기 연장을 위하여 주형-의존적 핵산 중합효소를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 65

제 36 항에 있어서, 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 열안정성 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제 35 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키트는 다운스트림 프라이머를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 PTO 절단 및 연장-의존적 절단(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage: PCEC) 어세이에 의한 타겟 핵산서열의 검출에 관한 것이다.

배경기술

[0002] DNA 혼성화(hybridization)는 분자 생물학의 기본적인 과정이며, 이온 강도, 염기 구성, 핵산 단편의 길이, 미스매칭 정도 및 변성제의 존재에 의해 영향을 받는다. DNA 혼성화-기반 기술은 특정 핵산 서열 결정에 매우 유용한 도구가 될 것이며, 임상 진단, 유전자 연구 및 법의학적인 실험 분석에 명확하게 도움이 될 것이다.

[0003] 그러나, 혼성화에만 의존하는 종래 방법 및 과정에서는 프로브와 비-타겟 서열간의 비-특이적인 혼성화로 인한 위양성 결과가 발생할 가능성이 높다. 따라서, 종래 방법 및 과정은 신뢰도를 개선하여야 하는 문제점이 남아 있다.

[0004] 프로브 혼성화 과정 이외에도 추가적으로 효소적 반응을 이용한 몇몇 접근법들, 예컨대, TaqMan™ 프로브 방법이 제시되었다.

[0005] TaqMan™ 프로브 방법에서, 타겟 핵산서열에 혼성화된 표지 프로브는 업스트림 프라이머-의존적 DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성에 의하여 절단되어, 타겟 서열의 존재를 나타내는 시그널을 발생시킨다(미국 특허 제 5,210,015호, 제5,538,848호 및 제6,326,145호). TaqMan™ 프로브 방법은 시그널 발생을 위한 두 가지 접근법을 제시한다: 중합-의존적 절단(polymerization-dependent cleavage) 및 중합-독립적 절단(polymerization-independent cleavage). 중합-의존적 절단에서, 업스트림 프라이머의 연장은 반드시 핵산 중합효소가 표지 프로브의 5' -말단에 접촉하기 전에 발생되어야 한다. 연장반응이 진행되면서, 중합효소는 표지 프로브의 5' -말단을 점점 절단한다. 중합-독립적 절단에서, 업스트림 프라이머 및 표지 프로브는 매우 근접하여 타겟 핵산서열에 혼성화 되고, 업스트림 프라이머의 3' -말단과 핵산 중합효소의 결합은 상기 핵산 중합효소가 표지 프로브의 5' -말단에 접촉하도록 하여 표지가 방출된다. 또한, TaqMan™ 프로브 방법은, 그의 5' -말단 부위에 타겟 서열과 혼성화 되지 않는 5' -테일구역을 갖는 표지 프로브가 절단되어 5' -테일구역을 포함하는 단편이 형성되는 것을 개시하고 있다.

[0006] 타겟 서열에 비-상보적인 5' -테일구역을 갖는 프로브가 5' 뉴클레아제에 의하여 절단되어 5' -테일구역을 포함하는 단편이 방출되는 몇몇 방법들이 보고되었다.

[0007] 예를 들어, 미국 특허 제5,691,142호는 DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성에 의하여 절단되는 절단구조를 개시하고 있다. 주형에 대해 비-상보적인 5' 부위 및 주형에 대해 상보적인 3' 부위를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 주형에 혼성화 되고, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 매우 근접하여 주형에 혼성화 되는 절단 구조가 예시되어 있다. 절단구조는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소 또는 감소된 합성 활성을 갖는 변형 DNA 중합효소에 의하여 절단되어 주형에 비-상보적인 5' 부위가 방출된다. 그 후 방출된 5' 부위는 헤어핀 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 절단구조를 형성하고, 이에 의해 점진적인 절단반응이 유도되어 타겟 서열이 검출된다.

[0008] 미국 특허 제7,381,532호는, 3' -말단이 블록킹된 업스트림 올리고뉴클레오타이드를 갖는 절단구조가, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제에 의하여 절단되어 비-상보적인 5' 플랩(flap)부위가 방출되고, 방출된 5' 플랩부위는 크기 분석 또는 상호작용적 이중 표지에 의하여 검출되는 과정을 개시하고 있다. 미국 특허 제6,893,819호는, 검출가능한 방출된 플랩이 핵산 합성 의존적인, 플랩-매개 연속적 증폭 방법에 의하여 생성되는 것을 개시하고 있다. 이 방법에서, 첫 번째 절단구조로부터 방출된 플랩은, 핵산 합성 의존적인 방식으로 두 번째 절단구조를 절단하여 플랩을 방출시키며, 방출된 플랩들을 검출한다.

[0009] 미국 출원 공개번호 제2008-0241838호는 타겟 핵산서열에 비-상보적인 5' 부위를 갖는 프로브의 절단 및 캡처(capture) 프로브의 혼성화를 이용한 타겟 검출 방법을 개시하고 있다. 표지는 비-상보적인 5' 부위에 위치한다. 타겟 서열에 혼성화된 표지 프로브는 절단되어 단편을 방출하며, 이후 단편은 캡처 프로브에 혼성화 되어 타겟 서열의 존재가 검출된다. 이 방법에서, 비절단된/온전한(uncleaved/intact) 프로브는 캡처 프로브에 혼성화 되지 않는 것이 필수적이다. 이를 위해서는, 짧은 길이를 갖는 캡처 프로브가 고상 기질 상에 고정화되

어야 한다. 그러나, 이러한 제한은 고상 기질에서의 혼성화의 효율성을 낮게 하고, 또한 반응 조건의 최적화도 어렵게 한다.

[0010] 따라서, 보다 편리하고, 신뢰성 및 재현성이 있는 방식으로, 혼성화 뿐만 아니라 5' 뉴클레오절단반응(5' nucleolytic reaction)과 같은 효소적 반응에 의하여 액상 및 고상에서 타겟 서열, 보다 바람직하게는 복수의 타겟 서열을 검출하기 위한 신규한 접근법에 대한 개발 요구가 대두되고 있다. 또한, 당업계에서 표지(특히, 형광 표지) 종류의 수에 제한받지 않는 신규한 타겟 검출 방법이 요구되고 있다.

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허들 및 문헌들이 참조되고 그 인용이 괄호로 표시되어 있다. 이러한 특허들 및 문헌들의 공개는 그 전체로서 본 명세서에 참조로 포함되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 보다 개선된 정확성 및 편의성을 가지고, 특히, 멀티플렉스 방식에서 타겟 서열을 검출하는 신규한 접근법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 타겟 서열을 검출하기 위한 신규한 프로토콜을 정립하였으며, 이러한 타겟 검출은 프로브 혼성화 뿐만 아니라 연속적인 절단 반응, 즉, PTO의 5' 핵산 절단반응 및 연장 이합체의 핵산 절단반응에 의하여 달성된다. 본 발명의 프로토콜은 고상 반응 뿐만 아니라 액상 반응에도 우수하게 적용되며, 보다 개선된 정확성 및 편의성을 가지고 복수의 타겟 서열이 검출되도록 한다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 PCEC(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage) 어세이를 이용하여, DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 PCEC(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage) 어세이를 이용하여, DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하기 위한 키트를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하는 방법을 제공한다:

[0017] (a) 상기 타겟 핵산서열을 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)와 혼성화 시키는 단계로서; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 PTO의 업스트림에 위치하고;

[0018] (b) 상기 PTO의 절단을 위한 조건 하에서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 상기 단계 (a)의 결과물을 접촉시키는 단계로서; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 연장 가닥은 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하며, 이러한 상기 절단은 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고;

[0019] (c) 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편과 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)를 혼성화 시키는 단계로서; 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적

인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CT0의 캡처링 부위에 혼성화되고;

- [0020] (d) 상기 단계 (c)의 결과물 및 주형-의존적 핵산 증합효소를 이용하여 연장반응을 실시하는 단계로서; 상기 CT0의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성되고;
- [0021] (e) 상기 핵산 절단효소를 이용하여 상기 연장 이합체를 절단하는 단계로서, 절단된 단편이 생성되며; 그리고
- [0022] (f) 상기 연장 이합체의 절단의 발생(occurrence)을 검출하는 단계로서; 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

[0023] 본 발명자들은 보다 개선된 정확성 및 편의성을 가지고, 특히, 멀티플렉스 방식에서 타겟 서열을 검출하는 신규한 접근법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 타겟 서열을 검출하기 위한 신규한 프로토콜을 정립하였으며, 이러한 타겟 검출은 프로브 혼성화 뿐만 아니라 연속적인 절단 반응, 즉, PTO의 5' 핵산 절단반응 및 연장 이합체의 핵산 절단반응에 의하여 달성된다. 본 발명의 프로토콜은 고상 반응 뿐만 아니라 액상 반응에도 우수하게 적용되며, 보다 개선된 정확성 및 편의성을 가지고 복수의 타겟 서열이 검출되도록 한다.

[0024] 본 발명은 다음의 연속적인 핵산절단 반응, 즉, 5' 핵산절단 반응에 의한 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)의 1차 절단 및 핵산절단 반응에 의한 연장 이합체의 2차 절단을 이용하며, 이에 의해 타겟 시그널이 생성된다. 따라서, 본 발명은 PCEC(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage) 어세이로 명명된다.

[0025] 본 발명의 PCEC 어세이의 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0026] **단계 (a): 타겟 핵산서열과 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO의 혼성화**

[0027] 본 발명에 따르면, 우선 타겟 핵산서열을 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)와 혼성화시킨다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 “타겟 핵산”, “타겟 핵산서열” 또는 “타겟 서열”은 검출하고자 하는 핵산서열을 의미하며, 혼성화, 어닐링 또는 증폭 조건 하에서 프로브 또는 프라이머와 어닐링 또는 혼성화된다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프로브(probe)”는 타겟 핵산서열에 실질적으로 상보적인 부위 또는 부위들을 포함하는 단일-가닥 핵산 분자를 의미한다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산 가닥(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 증합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다.

[0031] 바람직하게는, 프로브 및 프라이머는 단일-가닥 데옥시리보뉴클레오타이드 분자이다. 본 발명에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프로브 또는 프라이머는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0032] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)를 포함한 복수의 요소에 따라 결정된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고데옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 증합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 “혼성화(hybridization)”는 상보적인 단일 가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2 개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.

- [0034] 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO와 타겟 핵산서열의 혼성화는 최적화 절차에 의하여 일반적으로 결정되는 적합한 혼성화 조건 하에서 실시될 수 있다. 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 횟수, 버퍼 성분 및 이들의 pH 및 이온세기와 같은 조건은 올리고뉴클레오타이드(업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO)의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열을 포함한 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상대적으로 짧은 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 경우, 낮은 엄격조건(stringent condition)을 선택하는 것이 바람직하다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.
- [0035] 용어 “어닐링” 과 “혼성화” 는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.
- [0036] 업스트림 올리고뉴클레오타이드 및 PTO는 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “상보적” 은 소정의 어닐링 조건 또는 엄격조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, “실질적으로 상보적(substantially complementary)” 및 “완전히 상보적(perfectly complementary)” 인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0037] PTO의 5' -태깅 부위는 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)의 템플레이팅 부위는 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “비-상보적” 은 소정의 어닐링 조건 또는 엄격조건 하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산서열에 선택적으로 혼성화 되지 않을 정도로 충분히 비-상보적인 것을 의미하며, “실질적으로 비-상보적(substantially non-complementary)” 및 “완전히 비-상보적(perfectly non-complementary)” 인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 비-상보적인 것을 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 “PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)” 는 (i) 프로브로서의 역할을 하는 3' -타겟팅 부위 및 (ii) 타겟 핵산서열과의 혼성화 이후 절단되어 PTO로부터 방출되며 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5' -태깅 부위를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위는 반드시 5' →3' 순서로 위치한다. 도 1에서 PTO를 도식적으로 보여준다.
- [0039] 바람직하게는, 3' -타겟팅 부위가 타겟 핵산서열에 혼성화되고 5' -태깅 부위는 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않은 엄격조건 하에서 단계 (a)의 혼성화가 실시된다.
- [0040] PTO는 어떠한 특정 길이도 요구하지 않는다. 예를 들어, PTO의 길이는 15-150 뉴클레오타이드, 15-100 뉴클레오타이드, 15-80 뉴클레오타이드, 15-60 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드, 20-150 뉴클레오타이드, 20-100 뉴클레오타이드, 20-80 뉴클레오타이드, 20-60 뉴클레오타이드, 20-50 뉴클레오타이드, 30-150 뉴클레오타이드, 30-100 뉴클레오타이드, 30-80 뉴클레오타이드, 30-60 뉴클레오타이드, 30-50 뉴클레오타이드, 35-100 뉴클레오타이드, 35-80 뉴클레오타이드, 35-60 뉴클레오타이드 또는 35-50 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. PTO의 3' -타겟팅 부위가 타겟 핵산서열에 특이적으로 혼성화되는 한, 어떠한 길이도 가질 수 있다. 예를 들어, PTO의 3' -타겟팅 부위는 10-100 뉴클레오타이드, 10-80 뉴클레오타이드, 10-50 뉴클레오타이드, 10-40 뉴클레오타이드, 10-30 뉴클레오타이드, 15-100 뉴클레오타이드, 15-80 뉴클레오타이드, 15-50 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드, 15-30 뉴클레오타이드, 20-100 뉴클레오타이드, 20-80 뉴클레오타이드, 20-50 뉴클레오타이드, 20-40 뉴클레오타이드 또는 20-30 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. 5' -태깅 부위는 CTO의 템플레이팅 부위에 특이적으로 혼성화된 후 연장되는 한, 어떠한 길이도 가질 수 있다. 예를 들어, PTO의 5' -태깅 부위는 5-50 뉴클레오타이드, 5-40 뉴클레오타이드, 5-30 뉴클레오타이드, 5-20 뉴클레오타이드, 10-50 뉴클레오타이드, 10-40 뉴클레오타이드, 10-30 뉴클레오타이드, 10-20 뉴클레오타이드, 15-50 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드, 15-30 뉴클레오타이드 또는 15-20 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다.
- [0041] PTO의 3' -말단은 3' -OH 터미널(terminal)을 가질 수도 있다. 바람직하게는, PTO의 3' -말단은 “블록킹” 되어 그의 연장이 방지된다.
- [0042] 블록킹은 종래 방법에 따라 달성될 수 있다. 예를 들면, 블록킹은 마지막 뉴클레오타이드의 3' -히드록실기에 바이오틴, 표지, 포스페이트기, 알킬기, 비-뉴클레오타이드 링커, 포스포로티오에이트 또는 알칸-디올 잔기와 같은 화학적 모이어티(moiety)를 추가하여 실시할 수 있다. 택일적으로, 블록킹은 마지막 뉴클레오타이드의 3' -히드록실기를 제거하거나 또는 다이디옥시뉴클레오타이드와 같이 3' -히드록실기가 없는 뉴클레오타이드를 이용하여 실시할 수 있다.

- [0043] 택일적으로, PTO가 헤어핀 구조를 갖도록 디자인할 수 있다.
- [0044] PTO의 5' -태깅 부위 및 타겟 핵산서열 간의 비-혼성화는 특정 혼성화 조건하에서 그들 사이에 안정한 이중-가닥이 비-형성됨을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 타겟 핵산서열과의 혼성화에 관여하지 않는 PTO의 5' -태깅 부위는 단일-가닥을 형성한다.
- [0045] 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 PTO의 업스트림에 위치한다.
- [0046] 또한, 타겟 핵산서열에 혼성화된 업스트림 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 연장 가닥은 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 PTO의 절단을 유도한다.
- [0047] 업스트림 올리고뉴클레오타이드에 의한 PTO 절단의 유도는 두 가지 방식으로 달성될 수 있다: (i) 업스트림 올리고뉴클레오타이드 연장-독립적 절단 유도; 및 (ii) 업스트림 올리고뉴클레오타이드 연장-의존적 절단 유도.
- [0048] 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하는 데 충분할 정도로 PTO에 근접하게 위치하는 경우, 업스트림 올리고뉴클레오타이드에 결합한 상기 효소는 연장반응 없이 PTO를 절단한다. 반면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 PTO로부터 이격되어 있는 경우, 중합효소 활성을 갖는 효소(예컨대, 주형-의존적 중합효소)는 업스트림 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 업스트림 프라이머)의 연장을 촉진시키고, 연장산물에 결합된 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 PTO를 절단한다.
- [0049] 따라서, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 두 가지 방식으로 PTO에 대하여 상대적으로 위치할 수 있다. 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 연장-독립적인 방식으로 PTO의 절단을 유도하는 데 충분할 정도로 PTO에 근접한 위치에 위치할 수 있다. 택일적으로, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 연장-의존적인 방식으로 PTO 절단을 유도하는 데 충분할 정도로 PTO로부터 이격된 위치에 위치할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 지점(positions) 또는 위치(locations)를 언급하면서 사용되는 용어 “근접(adjacent)” 은 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 PTO의 3' -타겟팅 부위 바로 가까이에 위치하여 닉(nick)을 형성하는 것을 의미한다. 또한, 상기 용어는 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 PTO의 3' -타겟팅 부위로부터 1-30 뉴클레오타이드, 1-20 뉴클레오타이드 또는 1-15 뉴클레오타이드 이격되어 위치하는 것을 의미한다.
- [0051] 본 명세서에서 지점 또는 위치를 언급하면서 사용되는 용어 “이격(distant)” 은 연장반응이 일어나는데 충분할 정도의 어떠한 지점 또는 위치를 포함한다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 연장-의존적인 방식으로 PTO의 절단을 유도하는데 충분할 정도로 PTO로부터 이격되어 위치할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머 또는 업스트림 프로브이다. 업스트림 프라이머는 연장-독립적 절단 유도 또는 연장-의존적 절단에 적합하며, 업스트림 프로브는 연장-독립적 절단 유도에 적합하다.
- [0054] 택일적으로, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -일부와 부분적으로 겹치는 서열(partial-overlapped sequence)을 가질 수 있다. 바람직하게는, 겹치는 서열은 1-10 뉴클레오타이드 길이이며, 보다 바람직하게는 1-5 뉴클레오타이드, 보다 더욱 바람직하게는 1-3 뉴클레오타이드이다. 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -일부와 부분적으로 겹치는 서열(partial-overlapped sequence)을 갖는 경우, 단계 (b)의 절단반응에서 3' -타겟팅 부위는 5' -태깅 부위와 함께 부분적으로 절단된다. 또한, 겹치는 서열은 3' -타겟팅 부위의 원하는 특정 위치가 절단되도록 한다.
- [0055] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 프라이머는 그의 연장 가닥을 통하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 PTO의 절단을 유도한다.
- [0056] 업스트림 올리고뉴클레오타이드가 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단을 유도하여 PTO의 5' -태깅 부위 또는 PTO의 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편이 방출되는 한, 업스트림 올리고뉴클레오타이드에 의한 절단반응 관련 종래 기술들은 본 발명에 적용될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,210,015호, 제5,487,972호, 제5,691,142호, 제5,994,069호, 제7,381,532호 및 미국 출원 공개번호 제2008-0241838호는 본 발명에 응용할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 다운스트림 프라이머의 존재 하에서 실시하는 것이다. 다운스트림 프라이머는 PTO에 혼성화 되는 타겟 핵산서열을 추가적으로 생성시키며, 타겟 검출의 민감도를 향상시킨

다.

- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머를 이용하는 경우, 프라이머의 연장을 위하여 추가적으로 주형-의존적 핵산 중합효소를 사용한다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드(업스트림 프라이머 또는 업스트림 프로브), 다운스트림 프라이머 및/또는 PTO의 5' -태깅 부위는 본 발명자에 의해 개발된 이중 프라이밍 올리고뉴클레오타이드(DPO) 구조를 갖는다. DPO 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 종래 프라이머 및 프로브에 비하여 상당히 개선된 타겟 특이도를 나타낸다(참조 WO 2006/095981; Chun 등, Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35:6e40(2007)).
- [0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO의 3' -타겟팅 부위는 본 발명자에 의해 개발된 변형 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(mDSO) 구조를 갖는다. 변형 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(mDSO) 구조는 종래 프로브에 비하여 상당히 개선된 타겟 특이성을 나타낸다(참조 WO 2011/028041).
- [0061] **단계 (b): PTO로부터 단편의 방출**
- [0062] 이어, PTO의 절단을 위한 조건 하에서 단계 (a)의 결과물을 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 접촉시킨다. 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의하여 절단되어 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출한다.
- [0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 “PTO의 절단을 위한 조건”은 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의해 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단이 발생하는 데 충분한 조건, 예컨대 온도, pH, 이온세기 및 버퍼, 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 서열 그리고 효소를 의미한다. 예를 들어, 5' 뉴클레아제 활성을 가지는 효소로서 *Taq* DNA 중합효소가 이용되는 경우, PTO의 절단을 위한 조건은 Tris-HCl 버퍼, KCl, MgCl₂ 및 온도를 포함한다.
- [0064] PTO가 타겟 핵산서열에 혼성화 되는 경우, 그의 3' -타겟팅 부위는 혼성화에 포함되나 5' -태깅 부위는 타겟 핵산서열에 혼성화 되지 않고 단일-가닥을 형성한다(참조 도 2). 이와 같이, 단일-가닥 및 이중-가닥 구조 모두를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 알려진 다양한 기술에 의해 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 이용하여 절단될 수 있다.
- [0065] PTO의 절단 위치는 업스트림 올리고뉴클레오타이드(업스트림 프로브 또는 업스트림 프라이머)의 종류, 업스트림 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 위치 및 절단 조건에 따라 다양해진다(참조 미국 특허 제5,210,015호, 제5,487,972호, 제5,691,142호, 제5,994,069호 및 제7,381,532호 또는 미국 출원 공개번호 제2008-0241838호).
- [0066] PTO의 절단반응을 위하여 다수의 종래 기술을 이용할 수 있으며, 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출한다.
- [0067] 종합하면, 단계 (b)의 절단 반응에서 세 가지 절단 위치가 있을 수 있다. 첫 번째 절단 위치는 PTO의 혼성화 부위(3' -타겟팅 부위) 및 비-혼성화 부위(5' -태깅 부위) 간의 정션 위치(junction site)이다. 두 번째 절단 위치는 PTO의 5' -태깅 부위의 3' -말단으로부터 3' -방향으로 일부 뉴클레오타이드 이격된 위치이다. 두 번째 절단 위치는 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 위치한다. 세 번째 절단 위치는 PTO의 5' -태깅 부위의 3' -말단으로부터 5' -방향으로 일부 뉴클레오타이드 이격된 위치이다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 프라이머가 연장되면서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 중합효소에 의하여 PTO의 절단이 시작되는 위치는 PTO 및 타겟 핵산서열 간의 이중가닥이 시작되는 지점 또는 그 시작 지점으로부터 1-3 뉴클레오타이드 이격된 위치이다.
- [0069] 따라서, 본 명세서에서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 PTO의 절단을 언급하면서 사용되는 용어 “PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편”은 (i) 5' -태깅 부위, (ii) 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부 및 (iii) 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에서 용어 “PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편”은 “PTO 단편”으로 표현된다.
- [0070] 본 명세서에서 PTO의 5' -태깅 부위의 일부, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부 및 CTO의 캡처링 부위의 5' -말단 일부와 같이 PTO 또는 CTO를 언급하면서 사용되는 용어 “일부(part)”는 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10 또는 1-5 뉴클레오타이드로 구성된 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 바람직하게는 1, 2, 3 또는 4 뉴클레오

타이드이다.

- [0071] 본 명세서의 바람직한 구현예에 따르면, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제이며 보다 바람직하게는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 열안정성 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제이다.
- [0072] 본 발명에 적합한 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소는 다양한 박테리아종으로부터 얻은 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* 및 *Aquifex aeolicus*를 포함한다. 가장 바람직하게는, 열안정성 DNA 중합효소는 Taq 중합효소이다.
- [0073] 택일적으로, 본 발명은 중합효소 활성을 덜 갖도록 변형된, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소를 사용할 수 있다.
- [0074] 사용되는 FEN(flap endonuclease) 뉴클레아제는 5' 플랩-특이적 뉴클레아제(5' flap-specific nuclease)이다.
- [0075] 본 발명에 적합한 FEN 뉴클레아제는 다양한 박테리아 종으로부터 얻은 FEN 뉴클레아제를 포함하며, 이는 *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brierlyi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amyolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium brockii*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus zilligii*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* 및 *Archaeoglobus veneficus*를 포함한다.
- [0076] 단계 (a)에서 업스트림 프라이머를 이용하는 경우, PTO의 절단을 위한 조건은 업스트림 프라이머의 연장반응을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0077] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (a)에서 업스트림 프라이머를 이용하며, 상기 업스트림 프라이머의 연장을 위하여 주형-의존적 중합효소를 이용하고, 상기 주형-의존적 중합효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소와 동일한 효소이다.
- [0078] 선택적으로, 단계 (a)에서 업스트림 프라이머를 이용하며, 상기 업스트림 프라이머의 연장을 위하여 주형-의존적 중합효소를 이용하고, 상기 주형-의존적 중합효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소와 상이한 효소이다.
- [0079] 택일적으로, 본 발명은 업스트림 올리고뉴클레오타이드의 이용 없이 실시될 수 있다. PTO는 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 5' 뉴클레아제 활성에 의하여 절단될 수 있다. 이러한 경우, 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 종래 효소들을 이용할 수 있다. 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 중합효소 중에서, 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 일부 효소들이 있으며, 예컨대, Taq DNA 중합효소이다.
- [0080] 타겟 핵산서열의 증폭 및 PTO의 절단 효율을 고려하여, 바람직하게는, 업스트림 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 본 발명의 PCEC 어세이를 실시하는 것이다.
- [0081] **단계 (c): PTO로부터 방출된 단편과 CTO의 혼성화**
- [0082] PTO로부터 방출된 단편은 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)와 혼성화 된다.
- [0083] CTO는 3' →5' 방향으로 (i) PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함한다.
- [0084] CTO는 PTO로부터 방출된 단편의 연장을 위한 주형의 역할을 한다. 프라이머로서의 역할을 하는 상기 단편은 CTO

에 혼성화되고, 연장되어 연장 이합체를 형성한다.

- [0085] 템플레이팅 부위가 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 서열을 갖는 한, 어떠한 서열도 포함할 수 있다. 또한, 템플레이팅 부위가 PTO로부터 방출된 단편의 연장을 위한 주형의 역할을 할 수 있는 한, 어떠한 서열도 포함할 수 있다.
- [0086] 상술한 바와 같이, PTO의 5' -태깅 부위를 갖는 단편이 방출되는 경우, CTO의 캡처링 부위는 5' -태깅 부위에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 디자인 하는 것이 바람직하다. 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부를 갖는 단편이 방출되는 경우, CTO의 캡처링 부위는 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 디자인 하는 것이 바람직하다. PTO의 5' -태깅 부위의 일부를 갖는 단편이 방출되는 경우, CTO의 캡처링 부위는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 디자인 하는 것이 바람직하다.
- [0087] 한편, PTO의 절단 위치를 예상함으로써 CTO의 캡처링 부위를 디자인할 수 있다. 예를 들어, CTO의 캡처링 부위가 5' -태깅 부위에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 디자인하는 경우, 5' -태깅 부위의 일부를 갖는 단편 또는 5' -태깅 부위를 갖는 단편은 캡처링 부위와 혼성화 될 수 있으며 이후 연장된다. 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부를 포함하는 단편이 방출되는 경우, 상기 단편은 5' -태깅 부위에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 디자인 된 CTO의 캡처링 부위에 혼성화 될 수 있으며, 상기 단편의 3' -말단 부위에 미스매치 뉴클레오타이드가 존재함에도 불구하고, 성공적으로 연장될 수 있다. 이것은 프라이머의 3' -말단이 일부 미스매치 뉴클레오타이드(예컨대, 1-3 미스매치 뉴클레오타이드)를 포함함에도 불구하고, 프라이머가 반응 조건에 따라 연장될 수 있기 때문이다.
- [0088] 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부를 포함하는 단편이 방출되는 경우, CTO의 캡처링 부위의 5' -말단 일부는 상기 절단된 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖도록 디자인함으로써 미스매치 뉴클레오타이드와 관련된 문제를 해결할 수 있다(참조 도 1).
- [0089] 바람직하게는, 절단된 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 상보적인 CTO의 캡처링 부위의 5' -말단 일부의 뉴클레오타이드 서열은 PTO의 3' -타겟팅 부위 상의 예상되는 절단 위치에 따라 선택될 수 있다. 절단된 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 상보적인 CTO의 캡처링 부위의 5' -말단 일부의 뉴클레오타이드 서열은 1-10 뉴클레오타이드인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1-5 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 1-3 뉴클레오타이드이다.
- [0090] CTO의 3' -말단은 단편과의 혼성화에 포함되지 않는 추가적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, CTO가 상기 단편과 안정되게 혼성화 되는 한, CTO의 캡처링 부위는 상기 단편의 일부(예컨대, 단편의 3' -말단 부위를 포함하는 단편의 일부)에만 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 “5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위”는 상술한 바와 같이 CTO의 캡처링 부위의 다양한 디자인 및 구성을 포함하여 설명한다.
- [0092] CTO는 헤어핀 구조를 갖도록 디자인 할 수 있다.
- [0093] CTO의 길이는 다양해 질 수 있다. 예를 들어, CTO는 7-1000 뉴클레오타이드, 7-500 뉴클레오타이드, 7-300 뉴클레오타이드, 7-100 뉴클레오타이드, 7-80 뉴클레오타이드, 7-60 뉴클레오타이드, 7-40 뉴클레오타이드, 15-1000 뉴클레오타이드, 15-500 뉴클레오타이드, 15-300 뉴클레오타이드, 15-100 뉴클레오타이드, 15-80 뉴클레오타이드, 15-60 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드, 20-1000 뉴클레오타이드, 20-500 뉴클레오타이드, 20-300 뉴클레오타이드, 20-100 뉴클레오타이드, 20-80 뉴클레오타이드, 20-60 뉴클레오타이드, 20-40 뉴클레오타이드, 30-1000 뉴클레오타이드, 30-500 뉴클레오타이드, 30-300 뉴클레오타이드, 30-100 뉴클레오타이드, 30-80 뉴클레오타이드, 30-60 뉴클레오타이드 또는 30-40 뉴클레오타이드의 길이이다. CTO의 캡처링 부위는 PTO로부터 방출된 단편에 특이적으로 혼성화 되는 한, 어떠한 길이도 가질 수 있다. 예를 들어, CTO의 캡처링 부위는 5-100 뉴클레오타이드, 5-60 뉴클레오타이드, 5-40 뉴클레오타이드, 5-30 뉴클레오타이드, 5-20 뉴클레오타이드, 10-100 뉴클레오타이드, 10-60 뉴클레오타이드, 10-40 뉴클레오타이드, 10-30 뉴클레오타이드, 10-20 뉴클레오타이드, 15-100 뉴클레오타이드, 15-60 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드, 15-30 뉴클레오타이드 또는 15-20 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. CTO의 템플레이팅 부위는 PTO로부터 방출된 단편의 연장반응에서 주형의 역할을 할 수 있는 한, 어떠한 길이도 가질 수 있다. 예를 들어, CTO의 템플레이팅 부위는 1-900 뉴클레오타이드, 1-400 뉴클레오타이드, 1-300 뉴클레오타이드, 1-100 뉴클레오타이드, 1-80 뉴클레오타이드, 1-60 뉴클레오타이드, 1-40 뉴클레오타이드, 1-20 뉴클레오타이드, 2-900 뉴클레오타이드, 2-400 뉴클레오타이드, 2-300 뉴

클레오타이드, 2-100 뉴클레오타이드, 2-80 뉴클레오타이드, 2-60 뉴클레오타이드, 2-40 뉴클레오타이드, 2-20 뉴클레오타이드, 5-900 뉴클레오타이드, 5-400 뉴클레오타이드, 5-300 뉴클레오타이드, 5-100 뉴클레오타이드, 5-80 뉴클레오타이드, 5-60 뉴클레오타이드, 5-40 뉴클레오타이드, 5-30 뉴클레오타이드, 10-900 뉴클레오타이드, 10-400 뉴클레오타이드, 10-300 뉴클레오타이드, 15-900 뉴클레오타이드, 15-100 뉴클레오타이드, 15-80 뉴클레오타이드, 15-60 뉴클레오타이드, 15-40 뉴클레오타이드 또는 15-20 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다.

[0094] CTO의 3' -말단은 3' -OH 터미널을 가질 수 있다. 바람직하게는, CTO의 3' -말단은 그의 연장이 방지되도록 블록킹된다. CTO의 비-연장 블록킹은 종래 방법들에 따라 달성될 수 있다. 예를 들면, 블록킹은 CTO의 마지막 뉴클레오타이드의 3' -히드록실기에 바이오틴, 표지, 포스페이팅, 알킬기, 비-뉴클레오타이드 링커, 포스포로티오에이트 또는 알칸-디올 잔기와 같은 화학적 모이어티(moiety)를 추가하여 실시할 수 있다. 택일적으로, 블록킹은 마지막 뉴클레오타이드의 3' -히드록실기를 제거하거나 또는 다이디옥시뉴클레오타이드와 같이 3' -히드록실기가 없는 뉴클레오타이드를 이용하여 실시할 수 있다.

[0095] PTO로부터 방출된 단편은 CTO와 혼성화 되며, 단편의 연장에 적합한 형태를 제공한다. 또한, 비절단 PTO가 그의 5' -태깅 부위를 통하여 CTO의 캡처링 부위와 혼성화 되더라도, PTO의 3' -타겟팅 부위는 CTO에 혼성화 되지 않아, 연장 이합체의 형성이 방지된다.

[0096] 단계 (c)에서의 혼성화는 단계 (a)에서의 혼성화에 대한 설명을 참조하여 상세하게 설명될 수 있다.

[0097] **단계 (d): PTO 단편의 연장 및 핵산 절단효소의 절단 위치 생성**

[0098] 주형-의존적 핵산 중합효소 및 단계 (c)의 결과물을 이용하여 연장반응을 실시한다. CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 PTO 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(site)가 생성된다. 반면, CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 비절단 PTO는 연장되지 않으며, 이에 의해 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(site)도 생성되지 않는다.

[0099] 본 명세서에서 사용되는 용어 “연장 이합체”는 CTO의 캡처링 부위에 혼성화 된 단편이 주형-의존적 핵산 중합효소와 CTO의 템플레이팅 부위를 주형으로 이용하여 연장되는 연장반응에 의하여 형성된 이합체를 의미한다.

[0100] 연장 이합체의 형성에 따라, 핵산 절단효소에 의하여 절단될 수 있는 절단 위치가 생성된다. 이합체에 특이적으로 작용하는 많은 핵산 절단효소가 당업계에서 알려져 있다. 본 발명의 핵산 절단효소는 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 시그널을 제공한다.

[0101] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 제한효소이고, CTO의 템플레이팅 부위는 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함하며, 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 제한효소의 절단 위치를 생성시킨다. 제한효소 절단 위치가 생성된 연장 이합체는 제한효소에 의해 절단되어 절단 단편을 형성하며 이는 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

[0102] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 리보뉴클레아제이고, CTO의 템플레이팅 부위는 RNA 서열을 포함하며, 상기 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 형성시켜 리보뉴클레아제의 절단 위치가 생성된다.

[0103] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제이고, 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 CTO 상에 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치를 생성시킨다. CTO 상의 절단 위치는 연장 이합체의 형성 이후에 생성되며, 5' →3' 엑소뉴클레아제에 의해 절단되어 CTO의 5' -말단을 포함하는 절단 단편을 형성하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

[0104] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체 형성에 의해 생성된 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 DNA 이합체, RNA 이합체 또는 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 절단하는 핵산 절단효소의 절단 위치이다.

[0105] PTO 및/또는 CTO는 원하는 종류의 핵산 절단효소의 절단 위치가 생성되도록 제작 및 구성할 수 있다.

[0106] DNA 이합체에 작용하는 핵산 절단효소(예컨대, 제한 효소 및 5' →3' 엑소뉴클레아제)의 절단 위치를 생성시키고자 하는 경우, 각각 DNA 분자로 이루어진 PTO 및 CTO를 이용하는 것이 바람직하다. DNA 분자로 이루어진 PTO 단편은 dNTPs를 이용하여 연장되어 연장 이합체가 형성되고, 이에 의해 DNA 이합체에 작용하는 핵산 절단효소(예컨대, 제한 효소 및 5' →3' 엑소뉴클레아제)의 절단 위치가 생성된다.

- [0107] RNA 이합체에 작용하는 핵산 절단효소의 절단 위치를 생성시키고자 하는 경우, RNA 분자로 이루어진 PTO 또는 RNA 분자로 이루어진 5' -태깅 부위를 포함하는 PTO, 및 RNA 분자로 이루어진 CTO를 이용하는 것이 바람직하다. RNA 분자로 이루어진 CTO에 혼성화된 RNA 분자로 이루어진 PTO 단편은 NTPs를 이용하여 연장되어 연장 이합체가 형성되고, 이에 의해 RNA 이합체에 작용하는 핵산 절단효소의 절단 위치가 생성된다.
- [0108] DNA-RNA 하이브리드 이합체에 작용하는 핵산 절단효소의 절단 위치를 생성시키고자 하는 경우, DNA 분자로 이루어진 PTO 및 RNA 분자로 이루어진 템플레이팅 부위를 포함하는 CTO를 이용하는 것이 바람직하다. 템플레이팅 부위의 RNA 분자는 1-10개의 리보뉴클레오타이드를 포함한다. RNA 분자로 이루어진 템플레이팅 부위를 포함하는 CTO에 혼성화된 DNA 분자로 이루어진 PTO 단편은 dNTPs를 이용하여 연장되어 연장 이합체가 형성되고, 이에 의해 DNA-RNA 하이브리드 이합체에 작용하는 핵산 절단효소(예컨대, RNase H)의 절단 위치가 생성된다.
- [0109] 단계 (d)에서 연장 반응에 이용되는 주형-의존적 핵산 중합효소는 어떠한 핵산 중합효소도 포함되며, 예컨대, *E. coli* DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 상기 핵산 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Pyrococcus furiosus*(Pfu), *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* 및 *Aquifex aeolicus*를 포함한다. 가장 바람직하게는, 주형-의존적 핵산 중합효소는 Taq 중합효소이다.
- [0110] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)에서 이용되는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 단계 (d)에서 이용되는 주형-의존적 핵산 중합효소와 동일하다. 보다 바람직하게는, 단계 (b)에서 이용되는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소, 업스트림 프라이머의 연장을 위하여 이용되는 주형-의존적 핵산 중합효소 및 단계 (d)에서 이용되는 주형-의존적 핵산 중합효소는 서로 동일하다.
- [0111] **단계 (e): 핵산 절단효소를 이용한 연장 이합체의 절단**
- [0112] 연장 이합체 형성에 의해 핵산 절단효소의 절단 부위를 생성시킨 다음, 적합한 핵산 절단효소를 이용하여 연장 이합체를 절단하고, 절단 단편이 형성된다.
- [0113] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체의 절단 단편은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 연장 이합체의 절단은 최소 2 종의 단편을 형성시킬 수 있다. 예를 들어, 제한효소에 의한 연장 이합체의 절단은 이중 가닥 상태의 2 종의 절단 단편을 형성하고, 상기 이중-가닥 단편들은 반응 조건에 따라 단일 가닥 형태로 분리될 수 있다. 5' →3' 엑소뉴클레아제를 이용하는 절단 반응에서, 단일 절단 단편이 형성될 수 있다.
- [0114] 본 명세서에서, 단계 (b)의 절단반응은 1차 절단반응, 단계 (e)의 절단반응은 2차 절단반응으로 언급된다.
- [0115] 2차 절단반응에서 이용되는 핵산 절단효소는 당업계에 공지된 어떠한 효소도 포함한다.
- [0116] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 2차 절단반응에서 이용되는 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 및 리보뉴클레아제이고, 보다 바람직하게는 열안정성 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 또는 리보뉴클레아제이다.
- [0117] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 2차 절단반응에서 이용되는 핵산 절단효소는 이합체 분자에 특이적으로 작용하는 핵산 절단효소를 포함한다.
- [0118] 상기 핵산 절단효소 중에서, 5' →3' 엑소뉴클레아제는 DNA 이합체의 5' -말단을 절단한다. 도 2 및 도 5에 도시된 바와 같이, 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단에 의하여 형성된 PTO 단편이 CTO에 혼성화된 후 연장되어 연장 이합체가 형성된다. 연장 이합체에서 CTO의 5' -말단은 5' →3' 엑소뉴클레아제에 의해 절단되어 절단 단편을 형성하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

- [0119] 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 가지며, 몇몇 중합효소는 5' →3' 엔도뉴클레아제 활성도 가진다.
- [0120] 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소들은 단계 (b)에서 업스트림 올리고뉴클레오타이드-의존적 절단 반응을 유도할 수 있다(미국 특허 제5,210,015호 참조). 또한, 이것들은 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 절단 반응도 유도할 수 있다(lawyer et al, Genome Res. 1993, 2:275-287 및 WO 2008/011004 참조).
- [0121] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' →3' 엑소뉴클레아제는 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소이고, 보다 바람직하게는 열안정성 DNA 중합효소이다. 열안정성 DNA 중합효소는 단계 (b)의 기재내용을 참조하여 상세히 설명될 수 있다. 바람직하게는, 연장 이합체의 절단을 위한 5' →3' 엑소뉴클레아제는 *Taq* 중합 효소이다.
- [0122] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소는 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 절단 반응을 유도하여 단계 (e)에서 연장 이합체를 절단할 수 있다.
- [0123] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소는 단계 (b)에서 업스트림 올리고뉴클레오타이드-의존적 절단을 유도할 뿐 만 아니라, 단계 (e)에서 연장 이합체의 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 절단을 유도할 수 있다.
- [0124] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 주형-의존적 DNA 중합효소의 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성에 의한 연장 이합체의 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 절단은 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공하기에 충분한 효율을 나타낸다.
- [0125] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드-독립적 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소에 의한 연장 이합체의 절단은 연장 이합체에 존재하는 표지의 위치 또는 표지의 결합 유형에 영향을 받는다. 바람직하게는, 연장 이합체의 CTO의 5' -말단에 표지가 결합되는 경우, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소에 의한 연장 이합체의 절단은 CTO의 5' -말단의 포스페이트기에 표지가 연결된 경우, 특히, 카본 스페이서(carbon spacer)를 매개로 연결된 경우에 보다 효율적일 수 있다. 표지가 CTO의 5' -말단의 염기에 연결되거나 카본 스페이서를 매개로 연결되지 않는 경우, 연장 이합체의 절단이 일어나지 않을 수 있다.
- [0126] 핵산 절단효소로서 5' →3' 엑소뉴클레아제를 이용하는 경우, 연장 이합체의 절단 발생 검출을 위한 표지는 PTO에 결합되지 않는 것이 바람직하다.
- [0127] 핵산 절단효소들 중, 제한효소는 상기 단계 (d)에서 연장 이합체의 형성에 의해 생성된 제한효소 절단 위치를 절단한다. 도 3, 6 및 8에 도시된 바와 같이, 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단에 의하여 형성된 PTO 단편이 CTO(제한효소에 의하여 인식되는 서열 포함)에 혼성화된 후 연장되어, 제한효소 절단 위치를 갖는 연장 이합체가 형성된다. 제한효소는 이러한 연장 이합체를 핵산내부 절단방식으로(endonucleolytically) 절단하여 절단 단편을 형성하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.
- [0128] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 제한효소는 이합체의 특정 서열을 특이적으로 인식하여 이를 절단할 수 있는 제한효소이고, 보다 바람직하게는 열안정성 제한효소이다. 당업계에 알려진 다양한 제한 효소를 이용할 수 있다.
- [0129] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 리보뉴클레아제이고, CTO의 템플레이팅 부위는 RNA 서열을 포함하며, 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 형성시켜 리보뉴클레아제의 절단 위치가 생성된다. 리보뉴클레아제의 절단 위치는 리보뉴클레아제에 의해 단계 (e)에서 절단되어 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 절단 단편을 형성한다.
- [0130] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 리보뉴클레아제는 RNase H 또는 Exo III이다.
- [0131] RNase H는 DNA-RNA 하이브리드 이합체의 RNA 부위를 절단할 수 있는 엔도리보뉴클레아제 중 하나이다. 본 발명에서 RNase H가 이용되는 경우, CTO는 템플레이팅 부위에 RNA 분자를 포함하는 것이 바람직하다. 도 4, 도 7 및 도 9에 도시된 바와 같이, 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단에 의하여 형성된 PTO 단편이 CTO의 템플레이팅 부위에 혼성화된 후 연장되어 DNA-RNA 하이브리드 연장 이합체가 형성된다. RNase H가 DNA-RNA 하이브리드 연장 이합체를 핵산내부 절단방식(endonucleolytically)으로 절단하여 절단 단편을 형성하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.

- [0132] Exo III는 RNase 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Mol CD, et al., *Nature* 374(6520):381386(1995)). 본 발명에서 Exo III가 이용되는 경우, RNase H와 동일한 방식으로 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 절단 단편을 형성한다.
- [0133] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 열안정성 핵산 절단효소이다.
- [0134] **단계 (e): 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 연장 이합체의 절단의 발생 검출**
- [0135] 연장 이합체의 절단 반응 후, 연장 이합체의 절단의 발생을 검출함으로써 타겟 핵산서열의 존재를 확인한다.
- [0136] 연장 이합체의 절단 발생의 검출은 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다.
- [0137] 연장 이합체의 절단 발생은 연장 이합체의 절단 단편을 직접적으로 분석하여 검출할 수 있으며, 예를 들어, 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)이 있다. 이러한 경우, PTO 및/또는 CTO는 절단 단편이 단일 형광표지를 갖도록 제작하는 것이 바람직하며, 이에 의해 보다 편리한 방식으로 절단 단편을 검출할 수 있다.
- [0138] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체의 절단 발생의 검출은 시그널링 시스템을 이용하여 실시된다. 본 발명에서 채택된 시그널링 시스템은 연장 이합체 절단과 함께 시그널 발생이 연동(synchronization)되도록 한 것에 특징이 있다. 즉, 연장 이합체의 절단을 유도하여 검출가능한 시그널이 제공된다.
- [0139] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 시그널링 시스템은 연장 이합체의 절단에 따라 시그널 변화를 발생시킨다. 연장 이합체의 절단은 타겟 핵산서열이 존재하는 경우에만 발생되므로, 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 시그널은 시그널 변화와 함께 동시에 제공된다. 따라서, 필요한 경우, 본 발명은 실시간 방식으로 실시된다.
- [0140] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체는 최소 1 종의 표지를 갖고, 상기 표지는 상기 PTO 또는 CTO에 연결된 표지 또는 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)로부터 유래되며, 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 최소 1 종의 표지로부터의 시그널을 검출하여 실시한다.
- [0141] 본 발명에 적합한 표지의 예는 다음과 같이 상세하게 설명될 수 있다:
- [0142] **(i) 단일표지**
- [0143] 본 발명은 단일표지를 이용하여 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 연장 이합체 절단 발생에 대한 시그널을 제공할 수 있다.
- [0144] 단일표지는 특별히 제한되지 않으며, 형광 표지, 발광(luminescent) 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지 또는 전기화학적(electrochemical) 표지를 포함한다. 바람직하게는, 상기 단일표지는 형광표지이다.
- [0145] 올리고뉴클레오타이드와의 결합 또는 올리고뉴클레오타이드로부터 방출되는지의 여부에 따라 상이한 시그널을 나타내는 단일표지들이 있다. 이러한 단일표지를 이용하는 경우, 본 발명은 액상에서도 연장 이합체의 절단에 연동된 시그널링 시스템을 만들 수 있다. 예컨대, 형광성 테르비움 킬레이트(fluorescent terbium chelate)는 올리고뉴클레오타이드에 결합 또는 올리고뉴클레오타이드로부터 방출되는지의 여부에 따라 상이한 시그널을 제공한다(Nurmi et al, *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28 No.8 e28). 다른 예로는, 단일표지가 편광된 빛(plane polarized light)에 의한 여기를 통하여 편광된 형광(a polarized fluorescence)을 방출하는 염료(dye)인 경우, 절단 단편은 FP(Fluorescence polarization) 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 방출된 형광의 편광 정도는 표지가 연결된 분자의 움직임(motion)에 영향을 받는다. 일반적으로, 움직임이 빨라지면, 편광의 정도가 낮아진다(Latif 등, *Genome Research*, 11:436-440, 2001).
- [0146] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 단일표지를 갖고, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 연장 이합체가 절단되기 이전의 단일표지로부터 나오는 시그널은 연장 이합체가 절단된 이후의 단일표지로부터 나오는 시그널과 상이하어, 이러한 시그널들의 차이가 연장 이합체의 절단 발생이 검출되도록 한다.
- [0147] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO는 단일표지를 갖고, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 연장 이합체가 절단되기 이전의 단일표지로부터 나오는 시그널은 연장 이합체가 절단된 이후의 단일표지로부터 나오는 시그널과 상이하어, 이러한 시그널들의 차이가 연장 이합체의 절단 발생이

검출되도록 한다.

- [0148] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체의 절단에 따라 상이한 시그널을 제공하는 단일표지는 형광성 테르비움 칼레이트 또는 편광된 형광을 방출하는 단일표지이다.
- [0149] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단일표지는 CTO에 연결되어 있고, 보다 바람직하게는 CTO의 템플레이팅 부위, 보다 더욱 바람직하게는 CTO의 템플레이팅 부위의 5' -말단이다.
- [0150] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단일표지는 PTO에 연결되어 있고, 보다 바람직하게는 PTO의 5' -태깅 부위이다. 바람직하게는, PTO 단편이 단일표지를 가지도록 단일표지가 PTO 상에 위치한다.
- [0151] 본 발명에서 단일표지를 이용하는 경우, 본 발명은 고정화된 CTO를 이용하여 고상에서 실시하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 단일표지를 이용하여 고상에서 실시하는 경우, PTO 또는 CTO에 결합된 단일표지는 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공할 수 있다.
- [0152] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.
- [0153] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 단일표지를 갖고, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 절단 단편은 고상 기질로부터 방출되어, 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0154] 보다 바람직하게는, CTO는 그의 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, PTO는 단일표지를 가지며, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 절단 단편은 고상 기질로부터 방출되어, 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0155] CTO가 3' -말단을 통하여 고정화 되어 있고 단일표지를 이용하는 경우, 단일표지는 CTO의 템플레이팅 부위에 결합되어 있고, 핵산 절단효소의 절단 위치는 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 또는 리보뉴클레아제의 절단 위치인 것이 바람직하다.
- [0156] 도 5에 도시된 바와 같이, 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된 CTO에 PTO 단편이 혼성화되고 연장되어 연장 이합체가 형성이 되면 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치가 생성된다. 5' →3' 엑소뉴클레아제가 절단 위치를 절단함으로써 연장 이합체가 절단되어 CTO의 5' -말단으로부터 형광 리포터 분자가 방출된다. 타겟 핵산 서열이 존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸한다. 타겟 핵산서열이 부존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸하지 않는다.
- [0157] 택일적으로, CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, PTO는 단일표지를 가지며, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 절단 단편은 고상 기질로부터 방출되어, 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0158] 도 6에 예시된 바와 같이, 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된 CTO(템플레이팅 부위에 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함)에 PTO 단편이 혼성화 되고 연장되어 연장 이합체가 형성이 되면 제한효소의 절단 위치가 생성된다. 제한효소는 연장 이합체를 절단하여 CTO의 3' -말단으로부터 형광 리포터 분자를 방출시킨다. 타겟 핵산서열이 존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸한다. 타겟 핵산서열이 부존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸하지 않는다.
- [0159] 도 7은 RNase H를 이용하는 예를 보여준다. 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된 CTO(템플레이팅 부위에 RNA 분자를 포함)에 PTO 단편이 혼성화 되고 연장되어 연장 이합체가 형성이 되면 RNase H의 절단 위치가 생성된다. RNase H는 연장 이합체를 절단하여 CTO의 3' -말단으로부터 형광 리포터 분자를 방출시킨다. 타겟 핵산서열이 존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸한다. 타겟 핵산서열이 부존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸하지 않는다.
- [0160] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, PTO는 단일표지를 가지며, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 절단 단편은 고상 기질로부터 방출되어, 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0161] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단일표지는 PTO에 연결되어 있고, 보다 바람직하게는 PTO의 5' -태깅 부

위이다. 바람직하게는, PTO 단편이 단일표지를 가지도록 단일표지가 PTO 상에 위치한다.

- [0162] 도 8 및 도 9는 단일표지를 갖는 PTO를 이용하는 예를 보여준다. 도 8에서, 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된 CTO(템플레이팅 부위에 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함)에 PTO 단편이 혼성화 되고 연장되어 연장 이합체가 형성이 되면 제한효소의 절단 위치가 생성된다. 제한효소는 연장 이합체를 절단하여 PTO의 5' -말단으로부터 형광 리포터 분자를 방출시킨다. 타겟 핵산서열이 존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸한다. 타겟 핵산서열이 부존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸하지 않는다. 도 9에서, 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된 CTO(템플레이팅 부위에 RNA 분자를 포함)에 PTO 단편이 혼성화 되고 연장되어 연장 이합체가 형성이 되면 RNase H의 절단 위치가 생성된다. RNase H는 연장 이합체를 절단하여 PTO의 5' -말단으로부터 형광 리포터 분자를 방출시킨다. 타겟 핵산서열이 존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸한다. 타겟 핵산서열이 부존재하는 경우, 고정화된 CTO를 포함하는 스팟에서 형광이 감소하거나 소멸하지 않는다.
- [0163] 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 CTO가 고정화되고 단일표지를 이용하는 경우, 단일표지는 CTO 또는 PTO에 결합되고, 제한효소 또는 리보뉴클레아제와 같은 핵산 절단효소의 절단 위치가 생성되는 것이 바람직하다.
- [0164] 고상 반응에 이용되는 단일표지는 특정한 특징이 요구되지 않는다. 고상 반응을 위해서는, 어떠한 단일표지도 이용될 수 있다. 이는, 연장 이합체의 절단 이후 고상 기질 상의 단일표지의 존재 여부에 의하여 단일연장 이합체의 절단 발생에 따른 시그널의 차이가 유도될 수 있기 때문이다.
- [0165] 상술한 바와 같이, 2차 절단반응과 연계된 단일표지가 제공하는 시그널의 존재 여부 또는 시그널의 변화(세기의 증가 또는 감소)를 분석함으로써, 타겟 핵산서열을 검출할 수 있다.
- [0166] 상기 형광 단일표지의 바람직한 예는 다음과 같다: Cy2TM (506), YO-PROTM-1 (509), YOYOTM-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), Rhodamine 110 (520), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), RiboGreenTM (525), Rhodamine GreenTM (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium GreenTM (531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), DiI (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium OrangeTM (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red (615), Nile Red (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-phycoyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PROTM-3 (660), TOTO3 (660), DiD DiIc(5) (665), Cy5TM (670), Thiadicarbocyanine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biossearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) 및 Quasar 705 (610). 괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다.
- [0167] 바람직하게는, JOE, FAM, TAMRA, ROX 및 플루오레세인-기반 표지(fluorescein-based label)이다.
- [0168] 단일표지는 종래 방법들을 이용하여 CTO 또는 PTO에 결합될 수 있다. 바람직하게는, 표지는 최소 3개의 탄소 원자를 포함하는 스페이스(spacer)(예를 들어, 3-카본 스페이스, 6-카본 스페이스 또는 12-카본 스페이스)를 매개로 CTO 또는 PTO에 결합된다.
- [0169] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO에 결합되는 단일표지는 5' -말단 또는 그로부터 1-5 뉴클레오타이드 이격된 위치에 있다. 택일적으로, CTO에 결합되는 단일표지는 3' -말단 또는 그로부터 1-5 뉴클레오타이드 이격된 위치에 있다.
- [0170] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO에 결합되는 단일표지는 5' -말단 또는 그로부터 1-5 뉴클레오타이드 이격된 위치에 있다.
- [0171] **(ii) 상호작용적 이중표지**
- [0172] 상호작용적 표지 시스템은 공여체 분자 및 수용체 분자 사이에 에너지가 비-방사능적 (non-radioactively)으로 전달되는 시그널 발생 시스템이다. 상호작용적 표지 시스템의 대표적 예로서, FRET (fluorescence resonance energy transfer) 표지 시스템은 형광 리포터 분자 (공여체 분자) 및 퀀칭 분자 (수용체 분자)를 포함한다.

FRET에서 에너지 공여체는 형광성이나, 에너지 수용체는 형광성 또는 비-형광성일 수 있다. 상호작용적 표지 시스템의 다른 형태에서, 에너지 공여체는 비-형광성, 예컨대, 크로모포어(chromophore)이고 에너지 수용체는 형광성이다. 상호작용적 표지 시스템의 또 다른 형태에서, 에너지 공여체는 발광성(luminescent), 예컨대, 생물발광성, 화학발광성 또는 전기화학발광성이며 수용체는 형광성이다. 공여체 분자 및 수용체 분자는 본 발명에서 각각 리포터 분자 및 퀀처 분자로 설명될 수 있다.

- [0173] 바람직하게는, 연장 이합체의 절단 발생(즉, 타겟 핵산서열의 존재)을 나타내는 시그널은 상호작용적 표지 시스템에 의하여 발생되며, 보다 바람직하게는 FRET 표지 시스템(즉, 상호작용적 이중 표지 시스템)에 의해 발생된다.
- [0174] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상호작용적 표지는 CTO에 결합된다.
- [0175] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 CTO에 결합된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치하고, 연장 이합체가 형성되기 이전에는 퀀처 분자는 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하며, 연장 이합체의 절단은 리포터 분자와 퀀처 분자를 서로 분리시키고, 연장 이합체의 절단의 발생은 표지로부터의 시그널을 측정하여 검출된다.
- [0176] 본 발명의 상호작용적 표지 시스템은 액상 및 고상에서 유용하다.
- [0177] 상호작용적 표지 시스템을 이용하는 경우, 바람직하게는, 단계 (d)에서 생성되는 절단 위치는 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 또는 리보뉴클레아제의 절단 위치이다.
- [0178] 도 2는 연장 이합체 형성에 의한 5' →3' 엑소뉴클레아제 절단 위치의 도입을 보여준다. PTO 단편이 CTO에 혼성화되고 연장되어 연장 이합체가 형성되며, 이에 의해 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치가 생성된다. 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치는 CTO에 결합된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치한다.
- [0179] 연장 이합체가 형성되기 전에, 퀀처 분자는 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하기에 적합한 위치에 위치한다. 바람직하게는, 상기 두 개의 표지가 CTO 상의 거리에 따라 근접하게 있거나 또는 랜덤 코일 (coli) 및 헤어핀 구조와 같은 입체적 구조(conformational structure)를 형성하여 3 차원적인 방식으로 근접하게 있는 경우, 퀀칭이 발생한다.
- [0180] 5' →3' 엑소뉴클레아제는 연장 이합체의 5' -말단을 절단하고 형광 리포터 분자를 방출시켜 형광 리포터 분자로부터의 시그널 변화를 초래한다. 형광 시그널 변화를 측정하여 연장 이합체의 절단 발생을 검출하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재 여부를 결정한다.
- [0181] 퀀처 분자가 형광성인 경우, 퀀처 분자로부터의 시그널을 이용하여 측정하는 것이 바람직하다.
- [0182] 도 3은 연장 이합체 형성에 의한 제한효소 절단 위치의 도입을 보여준다. PTO 단편이 CTO에 혼성화되고 연장되어 연장 이합체가 형성되며, 이에 의해 제한효소의 절단 위치가 생성된다. 제한효소의 절단 위치는 CTO에 결합된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치한다. 제한효소가 절단 위치를 절단함으로써 연장 이합체를 절단하고 형광 리포터 분자를 방출시켜 형광 리포터 분자로부터의 시그널의 변화를 초래한다. 형광 시그널 변화를 측정하여 연장 이합체의 절단 발생을 검출하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재 여부를 결정한다.
- [0183] 도 4는 연장 이합체 형성에 의한 RNase의 절단 위치의 도입을 보여준다. PTO 단편이 CTO(템플레이팅 부위에 RNA 분자를 포함)에 혼성화되고 연장되어 연장 이합체가 형성되며, 이에 의해 RNase의 절단 위치가 생성된다. RNase의 절단 위치는 CTO에 결합된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치한다. RNase가 절단 위치를 절단함으로써 연장 이합체를 절단하고 형광 리포터 분자를 방출시켜 형광 리포터 분자로부터의 시그널의 변화를 초래한다. 형광 시그널 변화를 측정하여 연장 이합체의 절단 발생을 검출하며, 이는 타겟 핵산서열의 존재 여부를 결정한다.
- [0184] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 최소 하나는 CTO의 템플레이팅 부위에 결합되어 있으며, 보다 바람직하게는 CTO의 5' -말단이다.
- [0185] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리포터 분자 및 퀀처 분자 모두는 CTO의 템플레이팅 부위에 결합되어 있다.
- [0186] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 하나는 CTO의 5' -말단에, 다른 하나는 3' -말단에 결합되어 있다.
- [0187] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO의 템플레이팅 부위에 결합된 리포터 분자 또는 퀀처 분자는 그의 5'

-말단 또는 5' -말단으로부터 1-5 뉴클레오타이드 이격된 위치에 위치해 있다. 예를 들어, 퀀처 분자는 CTO의 템플레이팅 부위의 5' -말단 또는 5' -말단으로부터 1-5 이격된 위치에 위치할 수 있고, 리포터 분자는 퀀처 분자로부터 5-50 뉴클레오타이드 이격된 위치에 위치할 수 있다.

- [0188] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상호작용적 이중 표지는 연장 이합체가 형성되는 경우에는, 상호작용적 이중 표지 간의 퀀칭 상태가 유지되고, 연장 이합체의 절단에 의하여 표지가 방출되는 경우에는, 상호작용적 이중 표지 간의 언퀀칭 상태가 되는 적합한 위치에 위치한다.
- [0189] 연장 이합체의 절단 동안의 실시간 시그널 발생을 고려하여, 리포터 분자 및 퀀처 분자는 최대 25 뉴클레오타이드만큼 서로 이격된 위치에 위치하며, 보다 바람직하게는 최대 20 뉴클레오타이드, 보다 더욱 바람직하게는 최대 15 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 최대 10 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리포터 분자 및 퀀처 분자는 최소 3 뉴클레오타이드만큼 서로 이격된 위치에 위치하며, 보다 바람직하게는 최소 4 뉴클레오타이드, 보다 더욱 바람직하게는 최소 5 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 최소 6 뉴클레오타이드이다.
- [0190] 연장 이합체가 형성되는 경우, CTO 상의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 구조적으로 이격되어 퀀처 분자가 리포터 분자로부터의 시그널을 언퀀칭하도록 할 수 있다. 연장 이합체의 절단은 리포터 분자를 퀀처 분자로부터 완전히 분리시켜, 언퀀칭되면서 초래되는 시그널의 변화를 보다 크게 할 수 있다.
- [0191] 또한, 표지(예를 들어, 리포터 분자)를 갖는 절단 단편이 생성되므로, 보다 유연하거나 편리한 조건(예를 들어, 고-엄격 조건 또는 고상에서 세척 후 조건)하에서, 절단 단편에 결합된 표지로부터의 시그널을 직접 검출하여 연장 이합체의 절단 발생을 분석할 수 있다.
- [0192] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 고정화된 CTO에 결합된 상호작용적 이중표지 중 하나는, 연장 이합체의 절단 후 고상 기질 상에 잔류한다.
- [0193] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 고상 기질 상에 고정화된 CTO가 상호작용적 이중표지를 갖고 핵산 절단효소로서 5' →3' 엑소뉴클레아제를 이용하는 경우, 이합체로부터 CTO의 단편이 분리되기에 적합한 조건을 부여하거나 또는 CTO의 내부 뉴클레오타이드에 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성화에 대한 내성을 부여함으로써, 연장 이합체의 절단 후 상호작용적 이중표지 중 하나가 고상 기질 상에 확실하게 잔류하도록 할 수 있다.
- [0194] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' →3' 엑소뉴클레아제에 활성화에 대한 내성은 5' →3' 엑소뉴클레아제에 활성화에 대한 내성을 갖는 백본이 있는 뉴클레오타이드에 의하여 부여되며, 다양한 포스포포티오에이트 연결(linkage), 포스포네이트 연결, 포스포로아미데이트 연결 및 2' -카보하이드레이트 변형을 포함하고, 보다 바람직하게는 포스포포티오에이트 연결, 알킬 포스포트리에스테르 연결, 아릴 포스포트리에스테르 연결, 알킬 포스포네이트 연결, 아릴 포스포네이트 연결, 하이드로겐 포스포네이트 연결, 알킬 포스포로아미데이트 연결, 아릴 포스포로아미데이트 연결, 포스포로세레네이트 연결, 2' -O-아미노프로필 변형, 2' -O-알킬 변형, 2' -O-알릴 변형, 2' -O-부틸 변형, α-아노머릭 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 1-(4' -티오-β-D-리보푸라노실) 변형을 포함한다.
- [0195] 본 발명에 이용될 수 있는 리포터 분자 및 퀀처 분자는 당업계에 공지되어 있는 어떠한 물질도 포함할 수 있으며, 그 예는 상술한 형광 단일표지의 설명을 참조하여 설명할 수 있다.
- [0196] 적합한 리포터-퀀처 쌍은 다음과 같이 많은 문헌에 게시되어 있다: Pesce 등, editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White 등, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996); 미국 특허 제3,996,345호 및 제4,351,760호.
- [0197] 본 발명에서, 광범위 파장 또는 특정 파장의 형광을 퀀칭 할 수 있는 비-형광 블랙 퀀처 분자가 이용될 수 있다

는 것은 주목할 만하다. 비-형광 블랙 퀀처 분자의 예는 BHQ 및 DABCYL이다.

- [0198] 본 발명을 위한 FRET 표지에서, 리포터는 FRET의 공여체를 포함하고 퀀처는 FRET의 나머지 파트너(수용체)를 포함한다. 예컨대, 플루오레세인 색소(fluorescein dye)는 리포터로 이용되며, 로다민 색소 (rhodamine dye)는 퀀처로 이용된다.
- [0199] **(iii) 인터칼레이팅 표지(Intercalating label)**
- [0200] 본 발명에서는 인터칼레이팅 표지(intercalating label)를 이용하여 2차 절단반응과 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 시그널의 발생을 연계시킬 수 있다.
- [0201] 시료 내 존재하는 이중-가닥 핵산 분자가 시그널을 발생시킬 수 있기 때문에, 고정화된 CTO를 이용하는 고상 반응에서는 인터칼레이팅 표지가 보다 유용하다.
- [0202] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 인터칼레이팅 염료가 표지로 이용되며, 단계 (e)의 연장 이합체 절단은 인터칼레이팅 염료를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 절단 단편은 고상 기질로부터 방출되어, 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다. 이러한 경우, 단계 (e)의 2차 절단 반응은 제한효소 또는 RNase를 이용하여 실시하는 것이 바람직하다.
- [0203] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 고상 기질 상에 고정화되지 않은 절단 단편은 고상 기질로부터 해리된다.
- [0204] 본 발명에서 유용한 인터칼레이팅 염료의 예는, SYBRTM Green I, PO-PROTM-1, BO-PROTM-1, SYTOTM 43, SYTOTM 44, SYTOTM 45, SYTOXTM Blue, POPOTM-1, POPOTM-3, BOBOTM-1, BOBOTM-3, LO-PROTM-1, JO-PROTM-1, YO-PROTM 1, TO-PROTM 1, SYTOTM 11, SYTOTM 13, SYTOTM 15, SYTOTM 16, SYTOTM 20, SYTOTM 23, TOTOTM-3, YOYOTM 3, GelStarTM 및 thiazole orange를 포함한다. 인터칼레이팅 염료가 이중-가닥 핵산 분자 내에 특이적으로 끼어들어가서 시그널을 발생시킨다.
- [0205] PTO 및 CTO는 자연(naturally occurring) dNMPs로 구성될 수 있다. 택일적으로, PTO 및 CTO는 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드, 예컨대, PNA(Peptide Nucleic Acid, 참조 PCT 출원 제WO 92/20702호) 및 LNA(Locked Nucleic Acid, 참조 PCT 출원 제WO 98/22489호, 제WO 98/39352호 및 제WO 99/14226호)를 포함할 수 있다. PTO 및 CTO는 테옥시이노신, 이노신, 1-(2' -테옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 및 5-니트로인돌과 같은 유니버설 염기를 포함할 수 있다. 용어 “유니버설 염기”는 자연 DNA/RNA 염기들 각각에 대하여 거의 구별 없이 염기 쌍을 형성할 수 있는 것을 의미한다.
- [0206] 상술한 바와 같이, PTO는 PTO의 5' -태깅 부위의 3' -말단으로부터 3' -방향으로 이격된 한 위치에서 절단될 수 있다. 절단 위치는 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 위치할 수 있다. PTO 단편이 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부를 포함하는 경우, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 혼성화 되는 CTO의 위치는 유니버설 염기, 축퇴성 서열(degenerate sequence) 또는 그들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, PTO가 PTO의 5' -태깅 부위의 3' -말단으로부터 3' -방향으로 하나의 뉴클레오타이드만큼 이격된 한 위치에서 절단된다면, 상기 뉴클레오타이드와의 혼성화를 위하여 CTO의 캡처링 부위의 5' -말단 일부는 유니버설 염기를 포함하는 것이 유리하다. 만일, PTO가 PTO의 5' -태깅 부위의 3' -말단으로부터 3' -방향으로 2 개의 뉴클레오타이드만큼 이격된 한 위치에서 절단된다면, CTO의 캡처링 부위의 5' -말단은 축퇴성 서열을 포함하고, 그의 3' -방향으로 인접한 뉴클레오타이드는 유니버설 염기를 포함하는 것이 유리하다. 이와 같이, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부의 다양한 위치에서 PTO의 절단이 일어나는 경우, CTO에 유니버설 염기 및 축퇴성 서열을 이용하는 것이 유용하다. 또한, 업스트림 프라이머 연장-의존적 절단 유도 하에서, 동일한 5' -태깅 부위를 갖는 PTO를 복수의 타겟 핵산 서열 스크리닝에 이용하는 경우, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부가 서로 다른 PTO 단편들을 생성할 수 있다. 이러한 경우, 유니버설 염기 및 축퇴성 서열은 CTO에 유용하게 사용된다. CTO에 유니버설 염기 및 축퇴성 서열을 이용하는 전략은 복수의 타겟 핵산서열의 스크리닝을 위해서 한 타입의 CTO 또는 최소한의 타입의 CTO를 사용하도록 한다.
- [0207] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 단계 (a)-(b), (a)-(d), (a)-(e) 또는 (a)-(f)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함하며, 바람직하게는 다운스트림 프라이

머를 함께 포함한다. 이러한 반복은 타겟 핵산서열 및/또는 타겟 시그널을 증폭시킨다.

- [0208] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 단계 (a)-(b) 및 단계 (c)-(f) 또는 단계 (a)-(d) 및 단계 (e)-(f)는 하나의 반응용기 또는 개별 반응용기에서 실시한다.
- [0209] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 상기 단계 (a)-(b) 또는 (a)-(d)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0210] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (a)-(f)는 하나의 반응 용기 또는 개별 반응 용기들에서 실시한다. 예를 들면, 단계 (a)-(b), (c)-(d) 또는 (e)-(f)를 개별 반응 용기들에서 실시할 수 있다.
- [0211] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (a)-(b) 및 (c)-(f)는 반응 조건(특히, 온도)에 따라 하나의 반응 용기에서도 동시적 또는 개별적으로 진행될 수 있다.
- [0212] 특정 단계의 반복, 반복 시 변성의 개입, 특정 단계의 개별 실시 및 검출 시점이 다양하게 변경될 수 있다는 것은 당업계 통상의 지식을 가진 자에게 잘 인식된다.
- [0213] 업스트림 프라이머를 이용하여 반복을 실시할 경우, 반복은 다운스트림 프라이머의 존재 하에서 실시하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 PCR 방법에 의하여 실시한다. 업스트림 프로브를 이용하여 반복을 실시할 경우, 반복은 다운스트림 프라이머의 존재 하에서 실시하는 것이 바람직하다.
- [0214] 본 발명에서는 검출 및/또는 증폭하고자 하는 타겟 핵산서열이 모든 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포함하여 어떠한 특정 서열 또는 길이를 가지도록 요구하지 않는다.
- [0215] mRNA를 초기 물질로 이용하는 경우, 어닐링 단계 실시 이전에 역전사 단계가 필수적이며, 이의 상세한 내용은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 Noonan, K. F. 등, Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988)에 개시되어 있다. 역전사 반응을 위해서는, 랜덤 헥사머 또는 mRNA에 혼성화되는 올리고 dT 프라이머가 이용될 수 있다.
- [0216] 본 발명에서 검출 및/또는 증폭할 수 있는 타겟 핵산서열은 어떠한 자연(naturally occurring) 원핵세포 핵산, 진핵세포(예컨대, 원생동물과 기생동물, 균류, 효모, 고등 식물, 하등 동물 및 포유동물과 인간을 포함하는 고등동물) 핵산, 바이러스(예컨대, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 간염 바이러스, 폴리오바이러스 등) 핵산 또는 비로이드 핵산도 모두 포함한다.
- [0217] 또한, 본 발명은 뉴클레오타이드 변이의 검출에 유용하다. 바람직하게는 타겟 핵산서열은 뉴클레오타이드 변이를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “뉴클레오타이드 변이”는 연속적 DNA 세그먼트(segment)들 또는 서열이 유사한 DNA 세그먼트들에서 특정 위치의 DNA 서열에서의 모든 단일 또는 복수의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 이러한 연속적 DNA 세그먼트는 하나의 유전자 또는 하나의 염색체의 어떠한 다른 부위도 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드 변이는 돌연변이(mutant) 또는 다형성 대립유전자 변이(polymorphic allele variations)일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 검출되는 뉴클레오타이드 변이는 SNP (single nucleotide polymorphism), 돌연변이(mutation), 결실, 삽입, 치환 및 전좌를 포함한다. 뉴클레오타이드 변이의 예는, 인간 지놈에 있는 다양한 변이(예컨대, MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase) 유전자의 변이), 병원체의 약제 내성과 관련된 변이 및 암 발생-관련 변이를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 뉴클레오타이드 변이는 DNA 분자 내 특정 위치에서의 어떠한 변이도 포함한다. 즉, 용어 뉴클레오타이드 변이는 야생형 및 그의 DNA 분자 내 특정 위치에서의 어떠한 돌연변이 유형도 포함한다.
- [0218] 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이를 검출하는 본 발명에서, 사용되는 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는 경우, 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 타겟 핵산서열은 본 명세서에서 매칭 주형(matching template)으로 기재된다. 사용되는 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 비-상보적인 서열을 갖는 경우, 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 타겟 핵산서열은 본 명세서에서 미스매칭 주형(mismatching template)으로 기재된다.
- [0219] 뉴클레오타이드 변이의 검출을 위하여, 업스트림 프라이머의 3' -말단은 타겟핵산서열에서의 뉴클레오타이드 변이 위치의 맞은편에 위치하도록 디자인할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 프라이머의 3' -말단은 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는 업스트림 프라이머의 3' -말단은 매칭 주형에 어닐링되고 연장되어 PTO 절단을 유도한다. 결과물로서 PTO 단편은 CTO에 혼성화되어 타겟 시그널을 제공한다. 반대로, 업스트림 프라이머의 3' -말단이 미스매칭 주형에서 뉴클레오타이드 변이에 미스매치 되는 경우, 업스트림 프라이머가 미스

매칭 주형에 혼성화 되더라도, 연장반응을 위해서 프라이머의 3' -말단의 어닐링이 필수적인 조건하에서는 연장되지 않으며, 이에 타겟 시그널이 발생되지 않는다.

[0220] 택일적으로, 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는 PTO의 혼성화에 의존적인 PTO 절단을 이용할 수 있다. 예를 들어, 조절된 조건 하에서, 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는 PTO는 매칭 주형에 혼성화된 후 절단된다. 결과물로서 PTO 단편은 CTO에 혼성화 되어 타겟 시그널을 제공한다. 반면, 조절된 조건하에서, PTO는 뉴클레오타이드 변이 위치에 비-상보적인 서열을 갖는 미스매칭 주형에는 혼성화되지 않으며, 절단되지 않는다. 이러한 경우, 바람직하게는 PTO의 뉴클레오타이드 변이에 대한 상보적인 서열은 PTO의 3' -타겟팅 부위의 중간에 위치한다.

[0221] 택일적으로, 본 발명은, 특정 뉴클레오타이드 변이에 대한 PTO의 선별성을 위하여 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 위치하는 뉴클레오타이드 변이 구별 위치(nucleotide variation discrimination site)를 갖는 PTO를 이용한다. 뉴클레오타이드 변이의 검출을 위하여, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부가 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 위치하고, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부는 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는다.

[0222] 뉴클레오타이드 변이 구별 위치에 상보적인 뉴클레오타이드 변이를 갖는 타겟 핵산서열(즉, 매칭 주형(match template))에 PTO가 혼성화되는 경우, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부가 매칭 주형과 이중 가닥을 형성하지만; 뉴클레오타이드 변이 구별 위치에 비-상보적인 뉴클레오타이드 변이를 갖는 타겟 핵산서열(즉, 미스매칭 주형(mismatch template))에 PTO가 혼성화되는 경우, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부가 미스매칭 주형과 이중 가닥을 형성하지 않는다.

[0223] 본 명세서에서 PTO를 언급하면서 사용되는 용어 “뉴클레오타이드 변이 구별 위치(nucleotide variation discrimination site)”는 PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부의 타겟 핵산서열의 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열이다.

[0224] 이와 같이 관심있는 뉴클레오타이드 변이의 뚜렷한 혼성화 패턴이 PTO의 초기 절단 위치에서의 차이를 제공하며, 이에 의해 2 종의 PTO 단편이 생성되어 관심있는 뉴클레오타이드 변이의 존재 여부에 따라 시그널 차이가 발생한다는 것은 주목할 만하다.

[0225] 관심있는 뉴클레오타이드 변이의 존재 여부에 따라, PTO 및 매칭 주형간의 하이브리드(hybrid)의 절단에 의하여 생성된 1차 단편 및 PTO 및 미스매칭 주형간의 하이브리드(hybrid)의 절단에 의하여 생성된 2차 단편이 각각 생성된다. 2차 단편은, 1차 단편과는 상이한 2차 단편을 생성하도록 하는 추가적인 3' -말단을 포함한다.

[0226] 단일 뉴클레오타이드 변이의 검출을 위한 일 구현예에서, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단은 타겟 핵산서열의 단일 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 상술한 바와 같이, 매칭 주형에 혼성화된 PTO의 절단은 예컨대, 업스트림 프라이머 연장-의존적 절단 유도 하에서, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단에 3' -방향으로 바로 근접(immediately adjacent)한 한 위치에서 유도될 수 있다. PTO 단편의 3' -말단은 단일 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 뉴클레오타이드를 갖는다. PTO 단편은, 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 서열을 포함하는 캡처링 부위를 갖는 CTO에 혼성화된 후 연장되어 연장 이합체를 형성하여, 타겟 시그널을 제공한다. 만일, 동일한 PTO가, 단일 뉴클레오타이드 변이를 제외하고는 매칭 주형에 대하여 동일한 서열을 갖는 미스매칭 주형에 혼성화된다면, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단으로부터 3' -방향으로 2 개의 뉴클레오타이드 만큼 이격된 위치에서 PTO의 절단이 발생할 수 있다. PTO 단편의 3' -말단은 단일 뉴클레오타이드 변이에 상보적인 뉴클레오타이드 이외에 추가적으로 절단되는 뉴클레오타이드를 갖는다. 추가적으로 절단된 뉴클레오타이드에 혼성화되는 CTO의 위치가, 상기 추가적으로 절단되는 뉴클레오타이드에 대하여 비-상보적인 서열을 갖도록 디자인된 경우, PTO 단편의 3' -말단은 CTO에 혼성화 되지 않으며, 조절된 조건에서 PTO 단편이 연장되지 않는다.

[0227] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부에 뉴클레오타이드 변이에 대하여 상보적인 서열을 가지는 PTO의 절단 위치는, 매칭 주형 또는 미스매칭 주형과의 혼성화에 의존적으로 상이해지고, 이에 의해 상기 두 혼성화 이벤트로부터 방출되는 PTO 단편들은 상이한 서열을 가지며, 바람직하게는 그의 3' -말단 일부, 보다 바람직하게는 그의 3' -말단에서 상이한 서열을 갖는다.

[0228] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO 단편의 3' -말단 일부의 차이를 고려한 CTO의 뉴클레오타이드 서열의 선택으로 매칭 주형과 미스매칭 주형을 구별할 수 있다.

- [0229] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 어느 하나의 PTO 단편의 생성은 CTO 상의 연장 반응에 의하여 명백하게 검출될 수 있다.
- [0230] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 2차 단편이 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되는 경우, CTO가 선별된 서열을 갖고 있어, CTO는 2차 단편의 추가적인 3' -말단 부위에 혼성화되지 않으며 2차 단편을 연장으로부터 방지한다.
- [0231] 본 발명에서 기재한 바와 같이, 연장 이합체의 절단 발생에 의하여 1차 단편의 연장이 검출된다.
- [0232] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO의 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부는 뉴클레오타이드 변이 구별 위치로부터 1-10 이내의 뉴클레오타이드만큼 이격된 위치에 위치하는 비-염기 페어링 모이어티(non-base pairing moiety)를 포함하는 것이 바람직하다(보다 바람직하게는 1-5 이내의 뉴클레오타이드).
- [0233] 변이 구별 위치에 대하여 비-상보적인 뉴클레오타이드 변이를 갖는 타겟 핵산서열에 PTO가 혼성화되는 경우, 비-염기 페어링 모이어티는 3' -타겟팅 부위의 5' -말단 일부가 타겟 핵산서열과 이중 가닥을 형성하는 것을 방지한다.
- [0234] 비-염기 페어링 모이어티(예컨대, 미스매치 뉴클레오타이드)의 이용은 뉴클레오타이드 변이에 대한 PTO의 구별 능력을 향상시킨다.
- [0235] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 뉴클레오타이드 변이 구별 위치에 대하여 상보적인 뉴클레오타이드 변이를 갖는 타겟 핵산서열에 PTO가 혼성화되는 경우, 비-염기 페어링 모이어티는 5' -말단 일부가 타겟 핵산서열과 이중 가닥을 형성하는 것을 억제하지 않는다.
- [0236] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 비-염기 페어링 모이어티는, PTO와 매칭 주형의 하이브리드 상의 초기 절단 위치 및 PTO와 미스매칭 주형의 하이브리드 상의 초기 절단 위치 간의 거리를 확대시킨다.
- [0237] 비-염기 페어링 모이어티는 타겟 핵산서열간에 염기 쌍을 형성하지 않는 어떠한 모이어티도 포함한다. 바람직하게는, 비-염기 페어링 모이어티는 (i) 인위적인 미스매치 염기, 염기 페어링을 할 수 없도록 변형된 비-염기 페어링 염기 또는 유니버설 염기를 포함하는 뉴클레오타이드, (ii) 염기 페어링을 할 수 없도록 변형된 비-염기 페어링 뉴클레오타이드 또는 (iii) 비-염기 페어링 화합물이다.
- [0238] 예를 들어, 비-염기 페어링 모이어티는 알킬렌 기, 리보푸라노실 나프탈렌, 데옥시 리보푸라노실 나프탈렌, 메타포스포이트, 포스포로티오에이트 연결, 알킬 포스포트리에스테르 연결, 아릴 포스포트리에스테르 연결, 알킬 포스포네이트 연결, 아릴 포스포네이트 연결, 하이드로젠 포스포네이트 연결, 알킬 포스포로아미데이트 연결 및 아릴 포스포로아미데이트 연결을 포함한다. 통상적인 카본 스페이서 또한 비-염기 페어링 모이어티로 이용된다. 비-염기 페어링 모이어티로서의 유니버설 염기는 PTO의 절단 위치를 조정하는데 유용하다.
- [0239] 5' -말단 일부에 도입된 비-염기 페어링 모이어티는, 바람직하게는 1-10개의 모이어티를 갖고, 보다 바람직하게는 1-5개의 모이어티, 보다 더욱 바람직하게는 1-2개의 모이어티이다. 5' -말단 일부의 다수의 비-염기 페어링 모이어티는 연속적 또는 불연속적으로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 비-염기 페어링 모이어티는 2-5개의 연속적인 모이어티를 갖는다.
- [0240] 바람직하게는, 비-염기 페어링 모이어티는 비-염기 페어링 화합물이다.
- [0241] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 뉴클레오타이드 변이 구별 위치 및 PTO의 비-염기 페어링 모이어티는, 3' -타겟팅 부위의 5' -말단으로부터 10 이내의 뉴클레오타이드만큼 이격된 위치에 위치한다(보다 바람직하게는 8 뉴클레오타이드, 7 뉴클레오타이드, 6 뉴클레오타이드, 5 뉴클레오타이드, 4 뉴클레오타이드, 3 뉴클레오타이드, 2 뉴클레오타이드 또는 1 뉴클레오타이드, 보다 더욱 바람직하게는 1 뉴클레오타이드).
- [0242] 본 발명의 일 구현예에 따르면, PTO는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 절단에 대하여 내성을 갖는 최소 1 개의 뉴클레오타이드 블록커(blocker)를 포함하는 블록커 부위를 갖는다. 상기 블록커 부위는, 미스매치 주형과 PTO의 혼성화에 따라 초기에 절단되는 부위에 위치한다. 상기 블록커 부위는, 절단 위치에서의 절단 및 연속적인 절단을 방지한다.
- [0243] 블록커 부위에 포함되는 블록커의 개수는 제한되지 않으며, 바람직하게는 1-10 블록커, 보다 바람직하게는 2-10 블록커, 보다 더욱 바람직하게는 3-8 블록커, 가장 바람직하게는 3-6 블록커이다. 프로브에 존재하는 블록커는 연속적 또는 불연속적인 방식으로 존재할 수 있으며, 바람직하게는 연속적인 방식이다. 블록커로서의 뉴클레오타이드, 즉 5' → 3' 엑소뉴클레아제 활성에 대하여 내성을 갖는 백본을 포함하는 뉴클레오타이드는 당업계에서 알려진 어떠한 것도 포함한다. 예를 들어, 상기 뉴클레오타이드는 다양한 포스포로티오에이트 연결, 포스포네이트

트 연결, 포스포로아미데이트 연결 및 2' -카보하이드레이트 변형을 포함한다. 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 5' → 3' 엑소뉴클레아제에 대하여 내성을 갖는 백본을 포함하는 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 연결, 알킬 포스포트리에스테르 연결, 아릴 포스포트리에스테르 연결, 알킬 포스포네이트 연결, 아릴 포스포네이트 연결, 하이드로겐 포스포네이트 연결, 알킬 포스포로아미데이트 연결, 아릴 포스포로아미데이트 연결, 포스포로세레네이트 연결, 2' -0-아미노프로필 변형, 2' -0-알킬 변형, 2' -0-알릴 변형, 2' -0-부틸 변형, α-아노머릭 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 1-(4' -티오-β-D-리보푸라노실) 변형이다.

[0244] PTO 구조를 갖지 않는, 5' -말단 부위에 뉴클레오타이드 변이 구별 부위를 갖는 통상적인 선형 프로브(linear probe)가 미스매치 주형에 혼성화 되는 경우, 그의 5' -말단 부위는 특정 조건 하에서 단일 가닥을 형성할 수 있다. 이러한 프로브는 PTO에 해당할 수 있다. 본 발명의 PTO 어세이에 의하여 시그널이 발생될 수 있다. 이러한 접근법은, 프로브의 뉴클레오타이드 변이 구별 위치에 대하여 비-상보적인 뉴클레오타이드 변이를 갖는 타겟 핵산서열의 검출에 유용할 수 있다.

[0245] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 타겟 핵산서열은 전-증폭된 핵산서열이다. 전-증폭된 핵산서열의 이용은 본 발명의 타겟 검출의 민감도 및 특이성을 상당히 높게 증가시킨다.

[0246] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 다운스트림 프라이머의 존재 하에 실시된다.

[0247] 최소 2 종의 타겟 핵산서열이 동시에 검출(멀티플렉스 검출)된다는 점에서 본 발명의 이점이 더욱 두드러진다.

[0248] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하기 위해 실시된다(보다 바람직하게는 최소 3 종, 보다 더욱 바람직하게는 최소 5 종).

[0249] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하기 위해 실시되고(보다 바람직하게는 최소 3 종, 보다 더 바람직하게는 최소 5 종); 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 최소 2 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며(보다 바람직하게는 최소 3 종, 보다 더 바람직하게는 최소 5 종), PTO는 최소 2 종의 PTO를 포함하고(보다 바람직하게는 최소 3 종, 보다 더 바람직하게는 최소 5 종), CTO는 최소 1 종의 CTO를 포함한다(보다 바람직하게는 최소 2 종, 보다 더 바람직하게는 최소 3 종, 가장 바람직하게는 최소 5 종).

[0250] 최소 2 종의 PTO의 5' -태깅 부위는 서로 동일한 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 본 발명을 타겟 핵산서열의 스크리닝에 실시하는 경우, PTO의 5' -태깅 부위는 동일한 서열을 가질 수 있다.

[0251] 더욱이, 한 종류의 CTO를 다수의 타겟 핵산서열의 검출에 이용할 수 있다. 예를 들어, 5' -태깅 부위에 동일한 서열을 갖는 PTO들을 타겟 핵산서열의 스크리닝에 이용하는 경우, 한 종류의 CTO를 이용할 수 있다.

[0252] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 최소 2 종의 다운스트림 프라이머를 이용하여 실시된다.

[0253] 본 발명은 액상 또는 고상에서 실시할 수 있다.

[0254] 고상에서 고정화된 CTO를 이용한 타겟 검출

[0255] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 고상에서 실시되며, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다. 고상에서는, 고상 기질 상에서 제공되는 타겟 시그널을 측정한다.

[0256] 고상 기질 상에 고정화된 CTO를 이용하는 경우, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴) 또는 효소적 표지(예컨대, 알카라인 포스페이트, 퍼옥시다제, β-갈락토시다제 및 β-글루코시다제)를 이용할 수 있다.

[0257] 고상 반응을 위하여, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단(바람직하게는, 3' -말단)을 통하여 고상 기질의 표면에 직접적 또는 간접적으로(바람직하게는 간접적) 고정화된다. 또한, CTO는 공유 또는 비공유결합 방식으로 고상 기질 표면 상에 고정화될 수 있다. 고정화된 CTO가 고상 기질 표면에 간접적으로 고정화 되는 경우, 적합한 링커를 이용한다. 본 발명에서 유용한 링커는 고상 기질 표면 상의 프로브 고정화에 이용되는 어떠한 링커도 포함할 수 있다. 예를 들어, 아민기를 갖는 알킬 또는 아릴 화합물, 또는 티올기를 갖는 알킬 또는 아릴 화합물이 링커로써 CTO 고정화에 이용될 수 있다. 또한, poly (T) 테일 또는 poly (A) 테일이 링커로 사용될 수 있다.

- [0258] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 고상 기질은 마이크로어레이이다. 본 발명의 반응 환경을 제공하는 마이크로어레이는 당업계에 공지된 어떠한 것도 포함할 수 있다. 본 발명의 모든 과정, 즉, 타겟 핵산서열과의 혼성화, 절단, 연장, 멜팅 및 형광 검출은 마이크로어레이 상에서 실시된다. 마이크로어레이 상에 고정화된 CTO는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용된다. 마이크로어레이를 제작하기 위한 고상 기질은, 금속(예컨대, 금, 금과 구리의 합금, 알루미늄), 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 및 폴리아크릴아미드), 세파로스, 아가로스 및 콜로이드를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 다수의 고정화된 CTO는 고상 기질 상의 하나의 어드레서블(addressable) 부위 또는 복수의 어드레서블 부위에 고정화 될 수 있으며, 고상 기질은 2-1,000,000 개의 어드레서블 부위를 포함할 수 있다. 포토리토그래피, 잉크-젯팅, 기계적 마이크로스팟팅 및 이의 유사방법과 같은 종래 제작 기술에 의해, 어레이 또는 특정 응용을 위한 어레이를 생산하기 위하여 고정화된 CTO가 조립(fabricate)될 수 있다.
- [0259] 고상에서 실시하는 본 발명은, 고정화된 CTO 상의 표지는 물리적으로 이격되어 있기 때문에 한 종류의 표지를 이용하더라도 다수의 타겟 핵산서열을 동시에 검출할 수 있다. 따라서, 고상에서 본 발명에 의하여 검출가능한 타겟 핵산서열의 수는 제한되지 않는다.
- [0260] 고상에서 공초점 검출(confocal detection) 장비 등을 사용한다면, 액상에 존재하는 표지에 의한 시그널에 영향을 받지 않고 고상 기질 상만의 시그널을 측정할 수 있다.
- [0261] 본 발명에서, PTO 단편은 타겟 핵산서열에 혼성화된 PTO의 절단에 의하여 생성되며, PTO 단편은 CTO에 어닐링되고 CTO 상에서 연장되어 연장 가닥이 형성된다.
- [0262] 또한, (i) 연장 가닥에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위 및 (ii) 연장 가닥에는 비-상보적이나 CTO의 캡처링 부위에는 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하는 추가적인 PTO를 이용하여, 추가적인 5' 뉴클레아제 절단 반응에 의하여 연장 가닥의 수를 증가시키는, CTO 상에서 연장가능한 추가적인 단편들을 제공할 수 있다. 5' 뉴클레아제 절단 반응을 위하여, 연장 가닥에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 추가적인 PTO의 업스트림에 존재하는 추가적인 업스트림 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0263] 상기 바람직한 구현예는 추가적인 단편의 형성이 연장 가닥의 형성에 의존적인 것에 특징이 있다.
- [0264] 택일적으로, (i) CTO의 템플레이팅 부위에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위 및 (ii) CTO의 템플레이팅 부위에는 비-상보적이나 CTO의 캡처링 부위에는 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하는 추가적인 PTO를 이용하여, 추가적인 단편들을 제공할 수 있다.
- [0265] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 추가적인 연장 이합체는 연장 가닥의 추가적인 생성에 의하여 생성되며, 이는 고상 기질 상의 타겟 시그널의 증폭에 기여한다.
- [0266] 타겟 핵산서열 증폭을 이용한 바람직한 구현예
- [0267] 바람직하게는, 본 발명은 타겟 핵산서열을 합성할 수 있는 업스트림 프라이머 및 다운스트림을 포함하는 프라이머 한 쌍을 이용하여 타겟 핵산서열의 증폭과 동시에 실시된다.
- [0268] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하는 방법을 제공한다:
- [0269] (a) 상기 타겟 핵산서열을 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머를 포함하는 프라이머 한 쌍 및 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)와 혼성화 시키는 단계로서; 상기 업스트림 프라이머 및 상기 다운스트림 프라이머 각각은 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며; 상기 PTO는 상기 업스트림 프라이머 및 상기 다운스트림 프라이머 사이에 위치하고; 상기 PTO는 그의 3' -말단이 블로킹되어 연장이 방지되며;

- [0270] (b) 상기 프라이머들의 연장 및 상기 PTO의 절단을 위한 조건 하에서 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 핵산 중합효소에 단계 (a)의 결과물을 접촉시키는 단계로서; 상기 PTO가 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되는 경우, 상기 업스트림 프라이머는 연장되고 상기 연장 가닥은 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 핵산 중합효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하며, 이러한 상기 절단은 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고;
- [0271] (c) 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편과 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)를 혼성화 시키는 단계로서; 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 5' -태깅 부위 및 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되고;
- [0272] (d) 상기 단계 (c)의 결과물 및 주형-의존적 핵산 중합효소를 이용하여 연장반응을 실시하는 단계로서; 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성되고;
- [0273] (e) 상기 핵산 절단효소를 이용하여 상기 연장 이합체를 절단하는 단계로서, 절단된 단편이 생성되며; 그리고
- [0274] (f) 상기 연장 이합체의 절단의 발생(occurrence)을 검출하는 단계로서; 상기 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 타겟 핵산서열의 존재를 나타낸다.
- [0275] 본 발명의 바람직한 구현에는, 상술된 본 방법의 단계들을 따르기 때문에, 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0276] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 반복 사이클 사이에 변성과정을 포함하여 단계 (a)-(b), (a)-(d), (a)-(e) 또는 (a)-(f)를 반복하는 단계를 추가적으로 포함한다. 반응 반복은 타겟 핵산서열의 증폭을 동반한다. 바람직하게는, 상기 증폭은 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시한다.
- [0277] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하기 위하여 실시된다.
- [0278] 타겟 검출을 위한 키트
- [0279] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하며, PCEC(PTO 절단 및 연장-의존적 절단) 어세이에 의해 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산서열을 검출하기 위한 키트:
- [0280] (a) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide); 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3' -타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5' -태깅 부위를 포함하며; 상기 3' -타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되고, 상기 5' -태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화되지 않으며;
- [0281] (b) 업스트림 올리고뉴클레오타이드; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 상기 PTO의 업스트림에 위치하며; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 연장 가닥은 상기 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도하여 상기 PTO의 5' -태깅 부위 또는 5' -태깅 부위의 일부를 포함하는 단편을 방출하고; 및
- [0282] (c) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide); 상기 CTO는 3' →5' 방향으로 (i) 상기 PTO의 상기 5' -태깅 부위 또는 상기 5' -태깅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 상기 PTO의 상기 5' -태깅 부위 및 상기 3' -타겟팅 부위에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함하며; 상기 PTO로부터 방출된 상기 단편은 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화되고; 상기 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편은 연장되어 연장 이합체를 형성하며, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치(cleavage site)가 생성된다.
- [0283] 본 발명의 키트는 상술한 본 발명의 방법을 실시하기 위하여 구성된 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

- [0284] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 키트는 타겟 핵산 서열에 혼성화된 PTO를 절단하기 위한 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 추가적으로 포함한다.
- [0285] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 키트는 CTO의 캡처링 부위에 혼성화된 상기 단편의 연장에 의하여 형성된 연장 이합체의 절단을 위하여 핵산 절단효소를 추가적으로 포함한다.
- [0286] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제, 제한효소 또는 리보뉴클레아제이다.
- [0287] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 제한효소이고, CTO의 템플레이팅 부위는 제한효소에 의하여 인식되는 서열을 포함하며, 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 제한효소의 절단 위치를 생성시킨다.
- [0288] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 리보뉴클레아제이고, CTO의 템플레이팅 부위는 RNA 서열을 포함하며, 단계 (d)의 연장 이합체의 형성은 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 형성시켜 상기 리보뉴클레아제의 절단 위치가 생성된다.
- [0289] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 5' →3' 엑소뉴클레아제이고, 연장 이합체의 형성은 CTO 상에 5' →3' 엑소뉴클레아제의 절단 위치를 생성시킨다.
- [0290] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 DNA 이합체, RNA 이합체 또는 DNA-RNA 하이브리드 이합체를 절단하는 핵산 절단효소의 절단 부위이다.
- [0291] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리보뉴클레아제는 RNase H 또는 Exo III이다.
- [0292] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' →3' 엑소뉴클레아제는 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 주형-의존적 DNA 중합효소이다.
- [0293] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소는 열안정성 핵산 절단효소이다.
- [0294] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 연장 이합체는 최소 1 종의 표지를 갖고, 상기 표지는 PTO 또는 CTO에 연결된 표지 또는 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)로부터 유래되며, 연장 이합체의 절단의 발생은 상기 최소 1 종의 표지로부터의 시그널을 검출하여 실시한다.
- [0295] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 단일표지를 갖고, 연장 이합체의 절단은 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 연장 이합체가 절단되기 이전의 단일표지로부터 나오는 시그널은 연장 이합체가 절단된 이후의 단일표지로부터 나오는 시그널과 상이하여, 이러한 시그널들의 차이가 연장 이합체의 절단의 발생이 검출되도록 한다.
- [0296] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단일표지는 형광표지이다.
- [0297] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치는 CTO에 연결된 리포터 분자 및 퀀처 분자 사이에 위치하고, 연장 이합체가 형성되기 이전에는 퀀처 분자는 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하며, 연장 이합체의 절단은 리포터 분자와 퀀처 분자를 서로 분리시키고, 연장 이합체의 절단의 발생은 표지로부터의 시그널을 측정하여 검출한다.
- [0298] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 최소 하나는 CTO의 5' -말단에 연결된다.
- [0299] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정된다.
- [0300] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 단일표지를 갖고, 상기 연장 이합체 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0301] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 상기 PTO는 단일표지를 가지며, 상기 연장 이합체의 절단은 상기 단일표지를 포함하는 절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.
- [0302] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단일표지는 형광표지이다.
- [0303] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO는 그의 5' -말단 또는 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화 되어 있고, 인터칼레이팅 염료가 표지로 이용되며, 상기 연장 이합체 절단은 상기 인터칼레이팅 염료를 포함하는

절단 단편을 형성하며, 상기 절단 단편은 상기 고상 기질로부터 방출되어, 상기 고상 기질 상에서 시그널의 변화를 초래하여 상기 연장 이합체의 절단의 발생을 나타내는 시그널을 제공한다.

- [0304] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO 및/또는 CTO는 그의 3' -말단이 블록킹되어 연장이 방지된다.
- [0305] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머 또는 업스트림 프로브이다.
- [0306] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의해 상기 PTO의 절단을 유도할 정도로 상기 PTO에 근접해 있다.
- [0307] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 프라이머는 그의 연장 가닥을 통하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 상기 효소에 의한 상기 PTO의 절단을 유도한다.
- [0308] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, CTO의 캡처링 부위는 그의 5' -말단 부위에 상기 PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0309] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, PTO의 3' -타겟팅 부위의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 1-5 개의 뉴클레오타이드이다.
- [0310] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 키트를 이용하여 최소 2 종의 타겟 핵산서열을 검출하고; 상기 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 최소 2 종의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 PTO는 최소 2 종의 PTO를 포함하며, 상기 CTO는 최소 2 종의 CTO를 포함한다.
- [0311] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 최소 2 종의 PTO의 5' -태깅 부위는 서로 동일한 서열 또는 서로 상이한 서열을 포함한다.
- [0312] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 업스트림 올리고뉴클레오타이드는 업스트림 프라이머이고, 상기 키트는 상기 업스트림 프라이머의 상기 연장을 위하여 주형-의존적 핵산 중합효소를 추가적으로 포함한다.
- [0313] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 열안정성 DNA 중합효소 또는 FEN 뉴클레아제이다.
- [0314] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 키트는 다운스트림 프라이머를 추가적으로 포함한다.

[0315] 본 명세서에서 상술한 본 발명의 모든 키트는 버퍼, DNA 중합효소 조인자 및 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트와 같은 타겟 증폭 PCR 반응(예컨대, PCR 반응)을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 또한 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사효소, 다양한 버퍼 및 시약, 및 DNA 중합효소 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한 키트는 양성 대조군 및 음성 대조군 반응을 실시하는 데 필수적인 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 앞서 언급된 구성성분들을 포함하는 별도의 포장 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작된다.

발명의 효과

- [0316] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0317] (a) 본 발명은, 타겟 핵산서열의 존재 유무에 따라 형성되는 연장 이합체 상에 핵산 절단효소에 의하여 절단되는 절단 위치가 생성되는 것에 특징이 있다. 본 발명은 연장 이합체 절단의 발생을 검출하며, 이에 의해 타겟 핵산서열의 존재를 결정한다.
- [0318] (b) 다양한 방법들을 핵산 절단효소에 의한 연장 이합체의 절단 발생 검출에 이용할 수 있다. 연장 이합체 상의 절단 위치를 고려하여 단일표지, 상호작용적 이중표지 또는 인터컬레이팅 표지를 타겟 핵산서열의 존재를 나타내는 시그널을 발생시키는데 적용할 수 있다. 이러한 관점에서, 본 발명은 타겟 핵산서열의 실시간 검출에 매우 잘 적용된다.
- [0319] (c) 본 발명의 방법은 연장 이합체를 절단시키므로, 통상적인 방법에 있어서 일반적으로 겪게 되는 이합체 구조

를 유지하는 조건을 이용해야 하는 제한이 없다. 따라서, 본 발명의 방법에 있어서 타겟 핵산서열의 검출은 다양한 조건(예를 들어, 상대적으로 넓은 범위의 온도)하에서 실시될 수 있다.

[0320]

(d) 타겟 핵산서열을 고려할 것 없이 PTO의 5' -태깅 부위의 서열 및 CTO의 서열을 선택할 수 있다는 것은 주목할 만하다. 이것은 PTO의 5' -태깅 부위 및 CTO에 대한 서열의 풀을 사전-디자인(pre-design)이 가능하도록 한다. 비록 PTO의 3' -타겟팅 부위는 타겟 핵산서열을 고려하여 제작하여야 하나, CTO는 타겟 핵산서열의 정보 또는 타겟 핵산서열에 대한 고려 없이 기성 방식(ready-made fashion)으로 제작할 수 있다. 이러한 특징은 멀티플렉스 타겟 검출, 특히, 고상 기질 상에 고정화된 CTO를 이용하는 마이크로 어레이 상에서 두드러지는 이점을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0321]

도 1은 PCEC(PTO Cleavage and Extension-Dependent Cleavage) 어세이에 이용되는 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide) 및 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)의 도식적인 구조를 보여준다. 바람직하게는, PTO 및 CTO의 3' -말단은 블록킹되어 연장이 방지된다.

도 2는 5' →3' 엑소뉴클레아제에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 템플레이팅 부위에 리포터 분자 및 퀀처 분자를 갖는다.

도 3은 제한효소에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 템플레이팅 부위에 리포터 분자 및 퀀처 분자를 갖는다.

도 4는 RNase H에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 템플레이팅 부위에 리포터 분자 및 퀀처 분자를 갖는다.

도 5는 5' →3' 엑소뉴클레아제에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 템플레이팅 부위에 형광 단일표지를 갖는다. CTO는 그의 3' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.

도 6은 제한효소에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 캡처링 부위에 형광 단일표지를 갖는다. CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.

도 7은 RNase H에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. CTO는 그의 캡처링 부위에 형광 단일표지를 갖는다. CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.

도 8은 제한효소에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. PTO는 그의 태깅 부위에 형광 단일표지를 갖는다. CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.

도 9는 RNase H에 의하여 절단되는 절단 위치를 이용하는 PCEC 어세이의 구현예를 도식적으로 보여준다. PTO는 그의 태깅 부위에 형광 단일표지를 갖는다. CTO는 그의 5' -말단을 통하여 고상 기질 상에 고정화된다.

도 10은 PCEC 어세이에 의한 *Neisseria gonorrhoeae* 유전자의 실시간 검출 결과를 보여준다. CTO는 그의 템플레이팅 부위에 리포터 분자 및 퀀처 분자를 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0322]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0323]

실시예

[0324]

실시예 1: 5' →3' 엑소뉴클레아제를 이용하는 PCEC (PTO Cleavage and Extension-dependent Cleavage) 어세이의 평가

[0325]

신규한 어세이인 본 발명의 PCEC(PTO Cleavage and Extension-dependent Cleavage)어세이가 *Taq* DNA 중합효소의 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하여 타겟 핵산서열을 검출할 수 있는지에 대하여 평가하였다(도 2

참조).

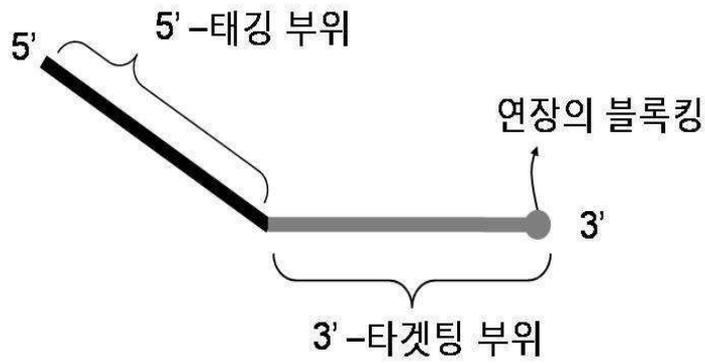
- [0326] 업스트림 프라이머의 연장, PTO의 절단 및 PTO 단편의 연장을 위하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 *Taq* DNA 중합효소를 이용하였다. 또한, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 *Taq* DNA 중합효소를 연장 이합체의 절단에 이용하였다.
- [0327] PTO 및 CTO의 3' -말단은 카본 스페이서(carbon spacer)로 블록킹하였다. PTO는 표지를 갖지 않는다. CTO는 그의 5' -말단에 형광 리포터 분자(FAM)를, 그리고 템플레이팅(templating) 부위에는 퀀처 분자(BHQ-1)를 갖는다. 어세이를 실시하는 동안 형성된 연장 이합체는 상호작용적 이중 표지를 갖는다. 연장 이합체는 그의 5' -말단부위에, *Taq* DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성으로 절단되는 절단 위치(site)를 갖는다. FAM으로 표지된 5' -말단은 *Taq* DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성에 의하여 절단되고, 상기 FAM은 BHQ-1으로부터 해리된다. *Neisseria gonorrhoeae*(NG) 유전자에 대한 합성 올리고뉴클레오타이드를 타겟 주형으로 이용하였다.
- [0328] 본 실시예에서 이용된 합성 주형, 업스트림 프라이머, PTO 및 CTO의 서열은 다음과 같다:
- [0329] NG-T 5' -AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTCTTTTGTTCCTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA
- [0330] CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)
- [0331] NG-R 5' -CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
- [0332] NG-PTO-1 5' - ACGACGGCTAGGCTTTACTGCCCCTCATTTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 3)
- [0333] NG-CTO-1 5' -[FAM]CCTCCTCCTCTCC[T(BHQ-1)]CCAGTAAAGCCTAGCCGTCGT[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 4)
- [0334] (밑줄 친 문자는 PTO의 5' -태깅 부위를 가리킨다)
- [0335] NG 유전자에 대한 합성 주형(SEQ ID NO: 1) 2 pmole, 업스트림 프라이머(SEQ ID NO: 2) 10 pmole, PTO(SEQ ID NO: 3) 5 pmole, CTO(SEQ ID NO: 4) 2.5 pmole, 2.5 mM MgCl₂ 함유한 2X 마스터 믹스 10 μl, dNTPs 200 M 및 H-*Taq* DNA 중합효소(Solgent, Korea) 1.6 unit을 함유한 20 μl의 최종 부피로 반응을 실시하였다; 상기 반응 혼합물을 함유하고 있는 튜브를 실시간 열순환기(CFX96, Bio-Rad)에 위치시켰다; 상기 반응 혼합물을 95°C에서 15 분간 변성시키고 95°C에서 30 초, 60°C에서 63 초 및 72°C에서 30 초 과정을 60 회 반복하였다. 각 사이클의 변성 단계(95°C)에서 발생된 시그널을 검출하였다. 변성 단계에서의 검출은, 연장 이합체의 절단되면서 초래된 이중 표지의 분리에 의하여 시그널이 발생하는지의 여부를 확인할 수 있도록 한다.
- [0336] 도 10에서 보여주는 바와 같이, 주형이 있는 경우 형광 시그널이 검출되었다. 주형이 없거나, PTO 또는 CTO가 없는 경우에는 시그널이 검출되지 않았다.
- [0337] 이러한 결과들은, 타겟 핵산서열이 5' →3' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하는 PCEC 어세이에 의하여 검출될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0338] **실시예 2: 제한효소를 이용하는 PCEC 어세이의 평가**
- [0339] 본 발명자들은 PCEC 어세이가 제한효소를 이용하여 타겟 핵산서열을 검출할 수 있는지에 대하여 추가적으로 평가하였다(도 3 참조).
- [0340] 업스트림 프라이머의 연장, PTO의 절단 및 PTO 단편의 연장을 위하여 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 *Taq* DNA 중합효소를 이용하였다. 열안정성 제한효소(PspGI)를 연장 이합체의 절단에 이용하였다.
- [0341] PTO 및 CTO의 3' -말단은 카본 스페이서(carbon spacer)로 블록킹하였다. PTO는 표지를 갖지 않는다. CTO는 그의 5' -말단에 형광 리포터 분자(Cal Fluoro Red 610)를, 그리고 템플레이팅(templating) 부위에는 퀀처 분자(BHQ-1)를 갖는다. 연장 이합체의 형성시에, CTO는 PspGI에 대한 제한효소 절단 사이트를 제공하도록 디자인된다. 어세이를 실시하는 동안 형성된 연장 이합체는 제한효소 절단 사이트에 의하여 나뉘어져 있는 상호작용적 이중 표지를 갖는다. 제한효소 사이트에서의 절단은 퀀처 분자(BHQ-1)로부터의 형광 리포터 분자(Cal Fluoro Red 610)의 분리를 초래한다.

- [0342] 본 발명자가 알고 있는 바에 따르면, Cal Fluoro Red 610로 표지된 연장 이합체의 5' -말단은 *Taq* DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성에 독립적인 업스트림 올리고뉴클레오타이드에 대하여 내성을 갖는다. *Neisseria gonorrhoeae*(NG) 유전자에 대한 합성 올리고뉴클레오타이드를 타겟 주형으로 이용하였다.
- [0343] 본 실시예에서 이용된 합성 주형, 업스트림 프라이머, PTO 및 CTO의 서열은 다음과 같다:
- [0344] NG-T 5' -AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA
- [0345] CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)
- [0346] NG-R 5' -CAATGGATCGGTACTACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)
- [0347] NG-PTO-2 5' - ACGACGGCTTGGCCCTCATGGCGTGTTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 5)
- [0348] NG-CTO-2 5' -[CAL Fluor Red 610]CCTCCTGGCCCTCTCC[T(BHQ-2)]CCTCCAGTAAAGCC
- [0349] AAGCCGTCGT[C3 Spacer]-3' (SEQ ID NO: 6)
- [0350] (밑줄 친 문자는 PTO의 5' -태깅 부위를 가리킨다)
- [0351] (굵은 문자는 PspGI에 대한 제한효소 절단 사이트를 가리킨다)
- [0352] NG 유전자에 대한 합성 주형(SEQ ID NO: 1) 2 pmole, 업스트림 프라이머(SEQ ID NO: 2) 10 pmole, PTO(SEQ ID NO: 5) 5 pmole, CTO(SEQ ID NO: 6) 2 pmole, 2.5 mM MgCl₂ 함유한 2X 마스터 믹스 10 μl, dNTPs 200 M, H-*Taq* DNA 중합효소(Solgent, Korea) 1.6 unit 및 PspGI (New England Biolabs, US) 1 unit을 함유한 20 μl의 최종 부피로 반응을 실시하였다; 상기 반응 혼합물을 함유하고 있는 튜브를 실시간 열순환기(CFX96, Bio-Rad)에 위치시켰다; 상기 반응 혼합물을 95℃에서 15 분간 변성시키고 95℃에서 30 초, 60℃에서 63 초 및 72℃에서 30 초 과정을 60 회 반복하였다. 각 사이클의 변성 단계(95℃)에서 발생된 시그널을 검출하였다.
- [0353] 주형이 있는 경우 형광 시그널이 검출되었다. 주형이 없거나, PTO 또는 CTO가 없는 경우에는 시그널이 검출되지 않았다.
- [0354] 이러한 결과들은, 타겟 핵산서열이 제한효소를 이용하는 PCEC 어세이에 의하여 검출될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0355] 본 발명의 바람직한 구현예를 상세히 기술하였으며, 본 발명의 원리를 따르는 변형 및 수정이 가능하고, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다는 것은 당업계 통상의 지식을 가진 자에게 잘 인식된다.

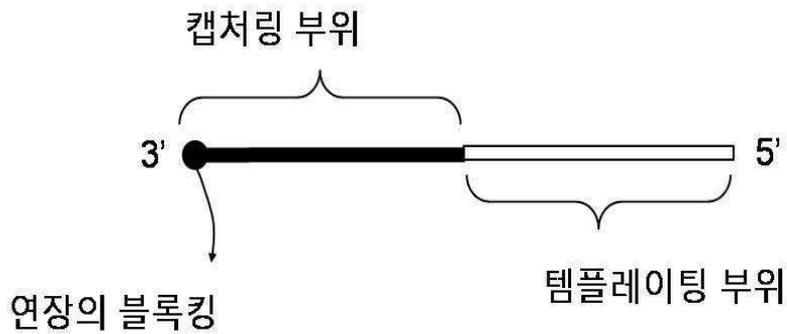
도면

도면1

A. PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide)

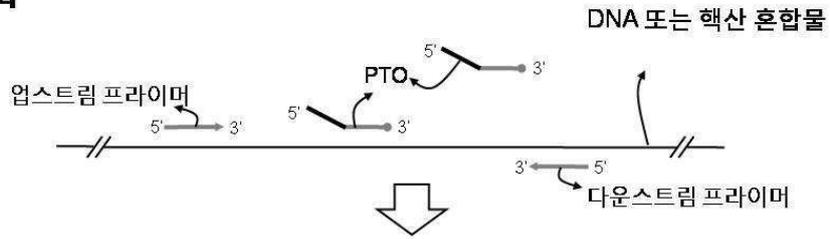


B. CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide)

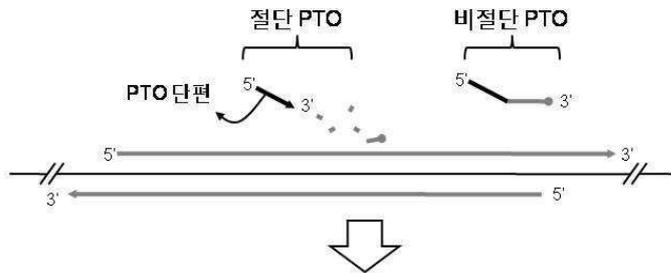


도면2

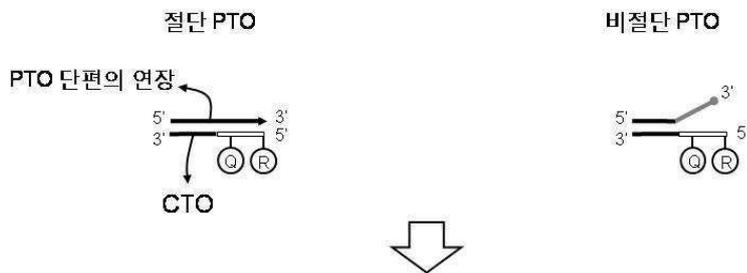
A. 혼성화



B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

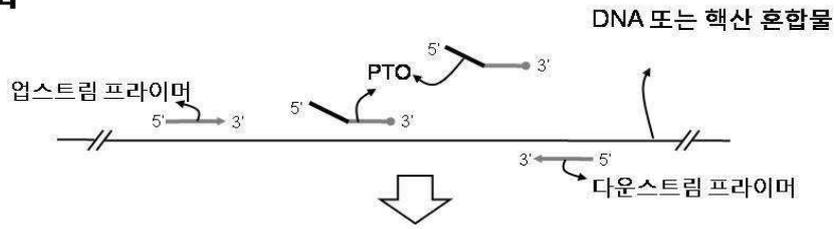


D. 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 절단 & 검출

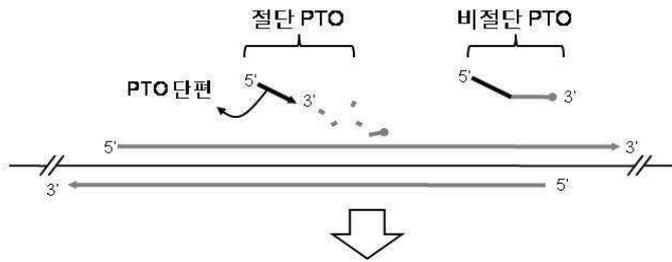


도면3

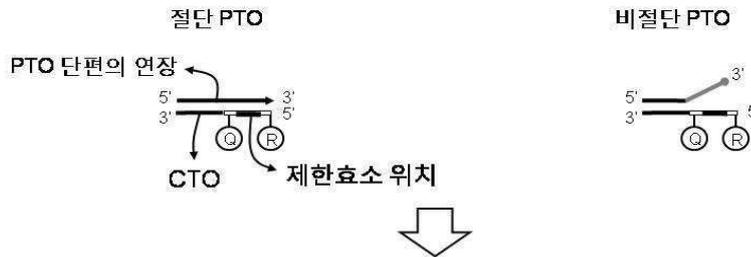
A. 혼성화



B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

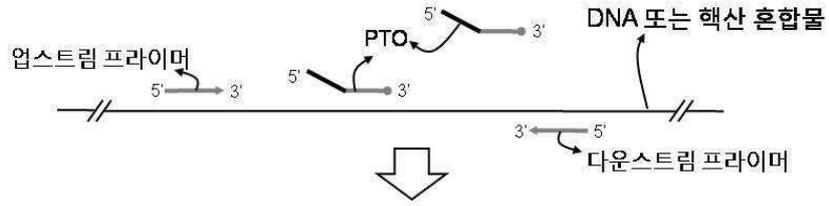


D. 제한효소에 의한 절단 & 검출

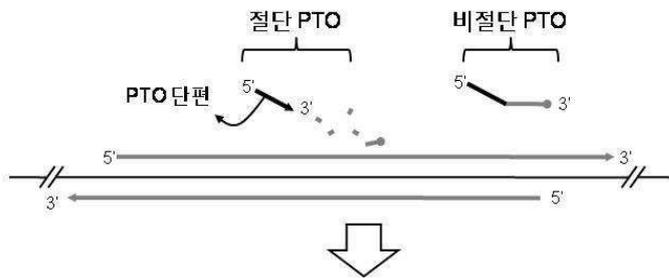


도면4

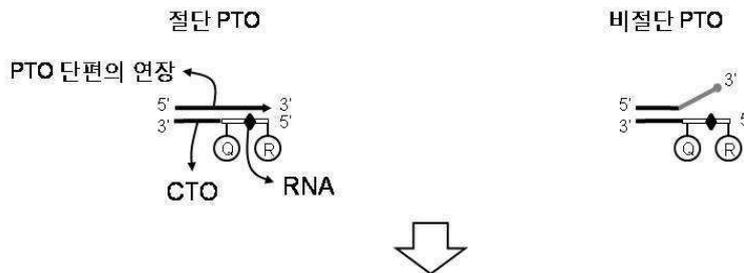
A. 혼성화



B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

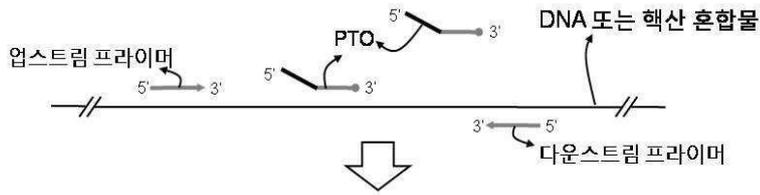


D. RNase H에 의한 절단 & 검출

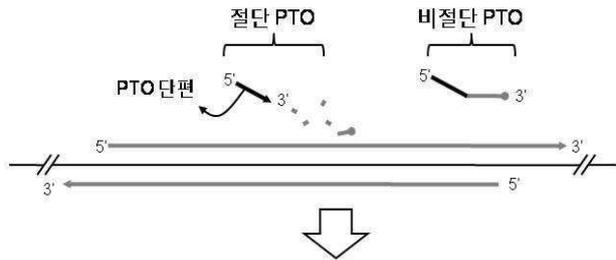


도면5

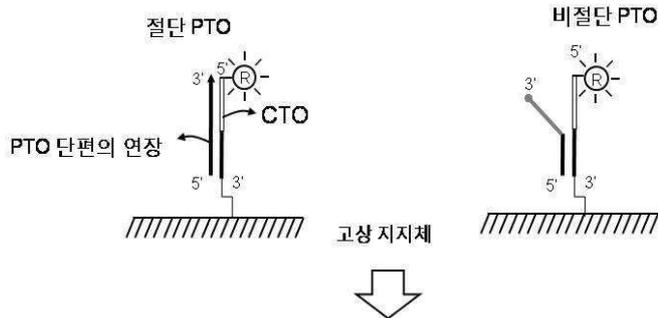
A. 혼성화



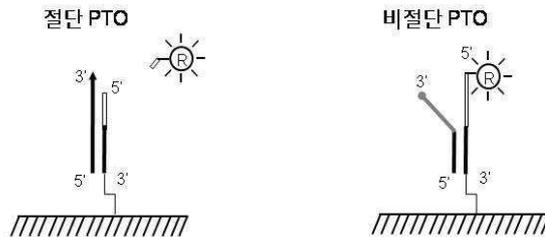
B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

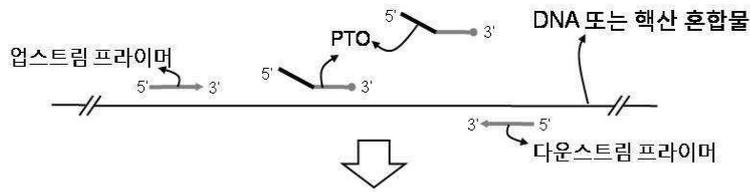


D. 5'→3' 엑소뉴클레아제에 의한 절단 & 검출

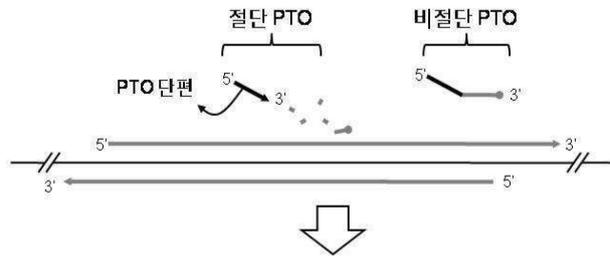


도면6

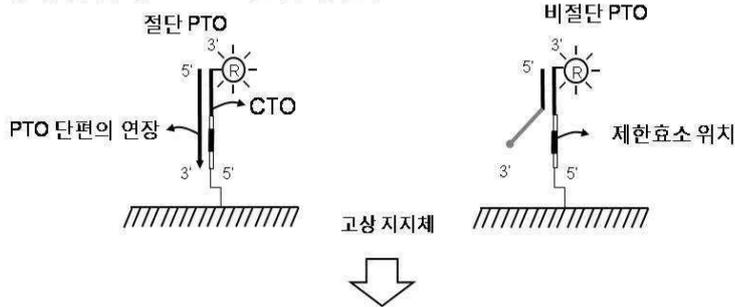
A. 혼성화



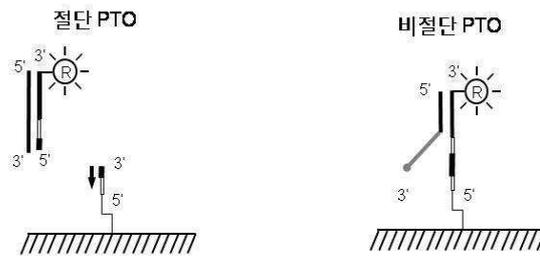
B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

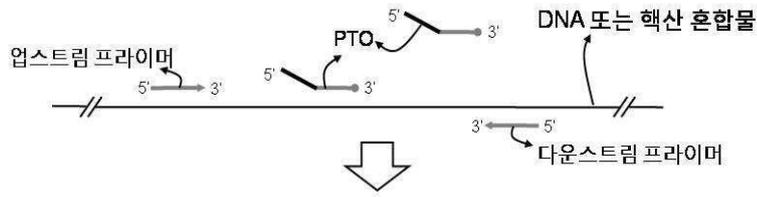


D. 제한효소에 의한 절단 & 검출

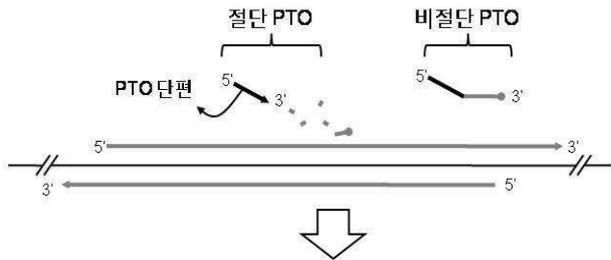


도면7

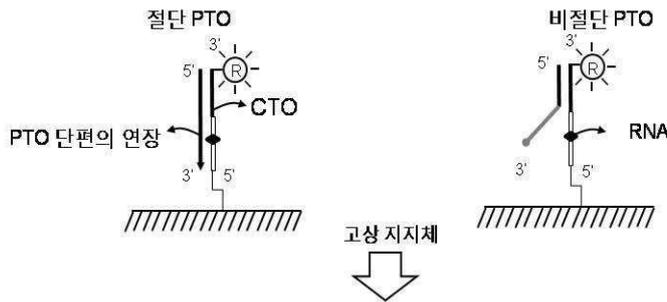
A. 혼성화



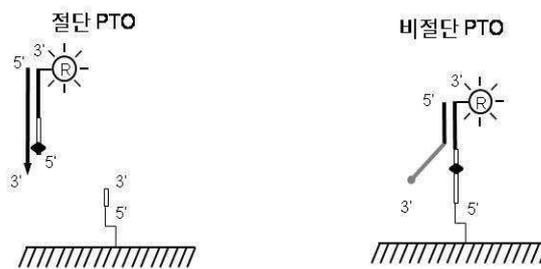
B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

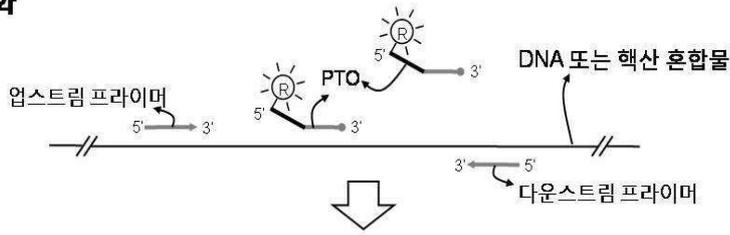


D. RNase H에 의한 절단 & 검출

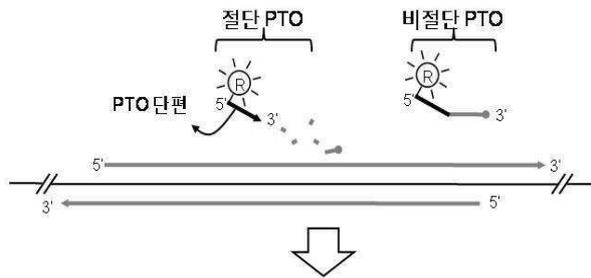


도면8

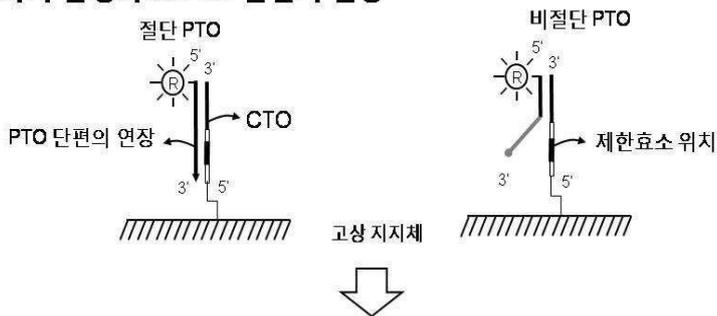
A. 혼성화



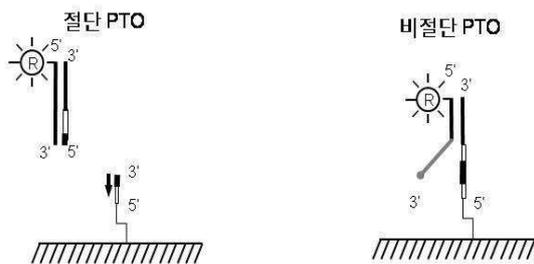
B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

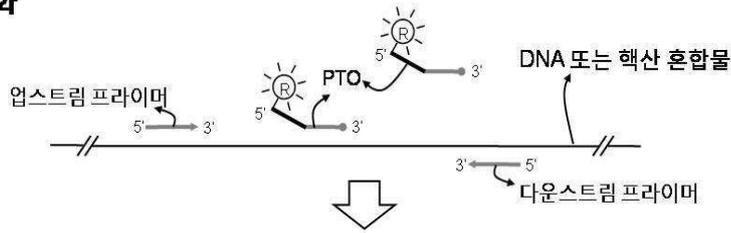


D. 제한효소에 의한 절단 & 검출

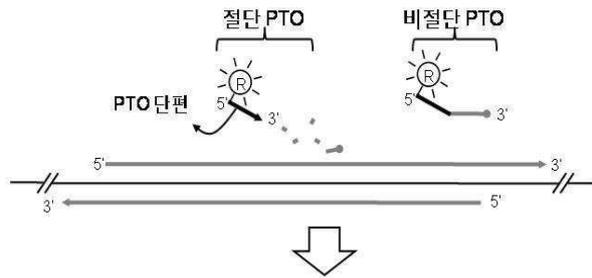


도면9

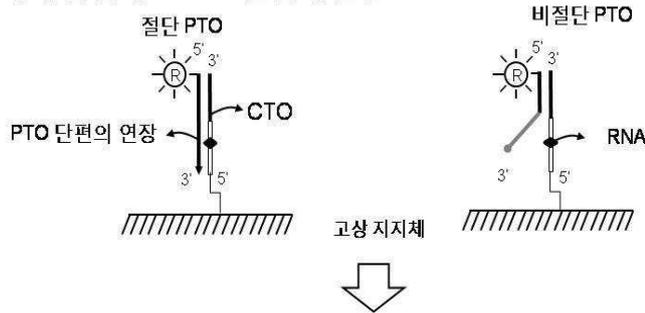
A. 혼성화



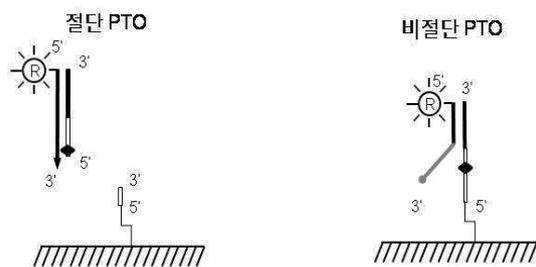
B. 프라이머 연장 & PTO의 절단



C. CTO와의 혼성화 & PTO 단편의 연장

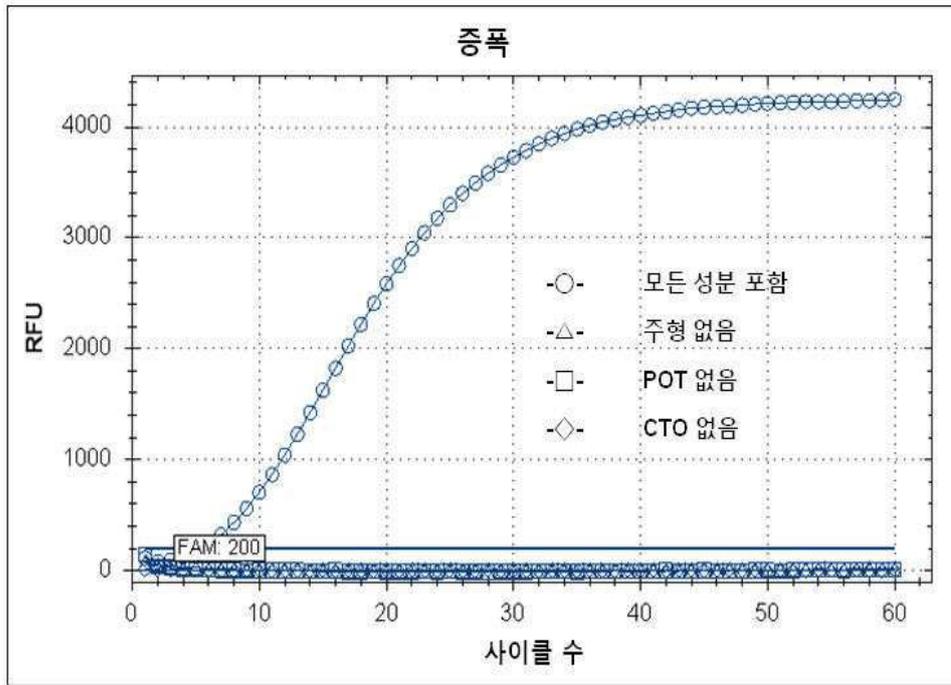


D. RNase H에 의한 절단 & 검출



도면10

PCEC 어세이를 이용한 타겟 검출



주형 ¹⁾	POT ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	5.43
-	+	+	-
+	-	+	-
+	+	-	-

- 1) 주형은 *Neisseria gonorrhoeae* 유전자에 대한 합성 올리고뉴클레오타이드이다.
- 2) POT (Probing and Tagging Oligonucleotide)는 그의 3'-말단이 카본 스페이서로 블록킹되어 있다.
- 3) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide)는 템플레이팅 부위에 형광 리포터 분자 및 퀴차 분자를 갖는다.

서열 목록

- <110> SEEGENE, INC.
- <120> DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCE BY POT CLEAVAGE AND EXTENSION-DEPENDENT CLEAVAGE
- <130> PP120029
- <150> KR 10-2011-0028345
- <151> 2011-03-29
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NG-T
 <400> 1
 aaatatgcga aacacgcca tgaggggcat gatgctttct tttgttctt gctcggcaga 60
 gcgagtgata cccgatccatt gaaaaa 86

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NG-R
 <400> 2
 caatggatcg gtatcactcg c 21

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NG-PTO-1
 <400> 3
 acgacggcta ggctttactg cccctcattg gcgtgtttcg 40

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NG-CTO-1
 <400> 4
 cctcctctc ctcctccagt aaagcctagc cgtcgt 36

<210> 5
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NG-PTO-2

<400> 5
acgacggctt ggcccctcat tggcgtgttt cg 32
<210> 6
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> NG-CT0-2
<400> 6
cctcctggcc ctctctctcc tccagtaaag ccaagccgtc gt 42